

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Patología Animal II
(Patología y Clínica Médico-Quirúrgica)



BASES MOLECULARES DE LA ACTIVACION
PLAQUETARIA EN EL PERRO

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Cristina Fragio Arnold

Bajo la dirección de los doctores

Francisco Moreno Martínez
Paloma Toni Delgado

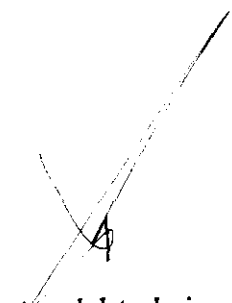
Madrid, 2002

ISBN: 978-84-8466-428-4

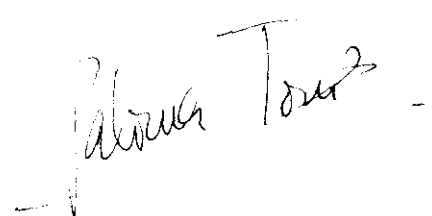
© Cristina Fragio Arnold, 1991

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Patología Animal II

BASES MOLECULARES DE LA ACTIVACION PLAQUETARIA EN EL PERRO

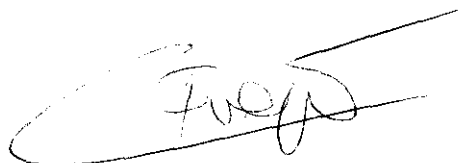


El Director del trabajo:
Dr. Francisco Moreno Martínez



El Co-Director:
Dra. Paloma Toni Delgado

Memoria que presenta la Lda. CRISTINA FRAGIO ARNOLD
para el acceso al grado de Doctor



Madrid, 1991

**A mis padres, a cuyos esfuerzos debo mi
formación universitaria**

A G R A D E C I M I E N T O S

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación ha sido realizado en el Departamento de Patología Animal II de la Facultad de Veterinaria de Madrid bajo la dirección del Dr. Francisco Moreno Martínez, a quien deseo agradecer no sólo su labor como Director, sino también el constante apoyo y la atención que me ha prestado durante la realización del trabajo, demostrando tanto su valía científica como personal.

A la Dra. Paloma Toni Delgado, Profesor Titular del Departamento y Codirectora de esta Tesis, por apoyarme en todo momento no solo en el terreno teórico sino también y sobre todo en el práctico, por enseñarme lo que es tener paciencia y fundamentalmente por dedicarme incondicionalmente su valioso tiempo.

También quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Manuel Rodríguez Sánchez, Director del Departamento de Patología Animal II, quien me introdujo en las tareas de investigación, me enseñó lo que significa en realidad tener espíritu universitario y desde el principio fue, más que un jefe, un amigo.

A la Dra. M^a Teresa Miras Portugal, Catedrática de Bioquímica de la Facultad de Veterinaria de Madrid, y a todo el personal de su Departamento, que pusieron siempre a mi disposición no sólo las instalaciones de su Laboratorio sino también sus valiosos conocimientos sobre el tema.

Al Dr. Eduardo Roldán Schuth, quien dirigió mi estancia en el I.A.P.G.R.C. de Cambridge (G.B.) enseñándome desinteresadamente muchas de las técnicas empleadas en el presente trabajo, y sobre todo, por haber contribuido de forma tan importante a mi formación investigadora fomentando en mí un espíritu crítico y científico que le agradezco profundamente.

A Pedro García Casado, Becario del I.N.I.A., aunque muy a su pesar ya que me consta que no quisiera figurar aquí, por facilitarme el acceso a las instalaciones de dicho Centro, y porque desde el primer momento me prestó su apoyo y su aliento, ayudándome incluso desinteresadamente en la realización del manuscrito.

Al Dr. Pedro Esbrit, de la Fundación Jiménez Díaz, y al personal de su Laboratorio, por permitirme generosamente la utilización de sus instalaciones.

Y por supuesto, a todo el personal del Departamento de Patología Animal II, que ha vivido la realización de este trabajo muy de cerca, ayudándome en todo momento al liberarme de algunas de mis obligaciones asumiéndolas con generosidad y verdadero espíritu de equipo.

RESUMEN

La secreción plaquetaria es un fenómeno complejo en el cual intervienen e interactúan diversos sistemas metabólicos intracelulares.

En el presente trabajo se ha estudiado la participación del metabolismo de polifosfoinosítidos y de los segundos mensajeros derivados de este último en la secreción de serotonina inducida por agonistas fisiológicos (trombina) y afisiológicos (ionóforo cálcico A23187, GTP γ S, NaF) en plaquetas caninas.

Asimismo, se ha abordado el estudio de las vías de liberación de ácido araquidónico en plaquetas caninas estimuladas por diversos agonistas, así como la implicación de este ácido graso y de sus metabolitos oxigenados activos (endoperóxidos cíclicos, Tromboxano-A₂) en la secreción plaquetaria de serotonina.

Se ha investigado también la existencia de proteínas-G-reguladoras en plaquetas caninas y su posible participación en los fenómenos de secreción.

Los resultados de nuestro trabajo demuestran la participación de la hidrólisis de polifosfoinosítidos en la secreción inducida por trombina, evidenciando no obstante la existencia de vías de activación alternativas independientes del metabolismo de polifosfoinosítidos y estimulables por calcio y/o proteínas-G-reguladoras.

Nuestros resultados indican asimismo que la formación de metabolitos oxigenados activos del ácido araquidónico no es indispensable para que se pueda producir la secreción en plaquetas caninas activadas por trombina o ionóforo A23187.

Finalmente, se describen los efectos inhibitorios de la albúmina de suero bovino (BSA) sobre la secreción plaquetaria de serotonina estimulada por trombina o ionóforo A23187.

INDICE

INDICE

<u>IMPORTANCIA DEL TEMA</u>	i
<u>OBJETIVOS DEL TRABAJO</u>	ii
<u>INTRODUCCION</u>	1
1. PAPEL DE LAS PLAQUETAS EN PROCESOS FISIOLÓGICOS Y PATOLÓGICOS	1
2.- RESPUESTAS PLAQUETARIAS DE ACTIVACION	2
2.1. Respuestas reversibles	3
2.1.1. Adhesión	3
2.1.2. Cambio de forma	4
2.1.2.1. Estructura de plaquetas en reposo	4
2.1.2.2. Estructura de plaquetas activadas	5
2.1.3. Agregación	7
2.1.3.1. Agregación primaria	7
2.2. Respuestas irreversibles	7
2.2.1. Agregación	7
2.2.1.1. Agregación secundaria	7
2.2.2. Secreción	9
3.- AGONISTAS PLAQUETARIOS FISIOLÓGICOS	9
3.1. Clasificación	9
3.2. Mecanismos de acción	10
3.2.1. Agonistas débiles e intermedios	10
3.2.1.1. ADP	10
3.2.1.2. Epinefrina	11
3.2.1.3. PAF	11
3.2.1.4. Vasopresina	12
3.2.1.5. Ácido araquidónico, endoperóxidos cíclicos y Tromboxano-A ₂	12

3.2.2. Agonistas fuertes	13
3.2.2.1. Colágeno	13
3.2.2.2. Trombina	13
4.- MECANISMOS DE ACTIVACION PLAQUETARIA	15
4.1. Activación plaquetaria vía receptor	15
4.1.1. Unidad de transducción de membrana	16
4.1.1.1. Receptor	17
4.1.1.2. Proteínas-G-reguladoras	17
4.1.1.2.1. Proteínas-G en plaquetas	19
4.1.1.2.2. Existencia de Gp en plaquetas	20
4.1.1.2.3. Regulación de Gp en plaquetas	21
4.1.1.3. Fosfolipasa-C	22
4.1.2. Segundos mensajeros	23
4.1.2.1. Segundos mensajeros transmisores de señales de activación	23
4.1.2.1.1. Formación y metabolismo de Inositol(1,4,5)Trisfosfato	26
4.1.2.1.2. Formación y metabolismo de 1,2-Diacilglicerol	29
4.1.2.2. Segundos mensajeros transmisores de señales de inhibición	32
4.1.2.2.1. AMP cíclico	32
4.1.3. Señales intracelulares	33
4.1.3.1. Sistema Calcio/Calmodulina	33
4.1.3.1.1. Regulación de los niveles intraplaquetarios de calcio	34
4.1.3.2. Proteína-Quinasa-C	35
4.1.4. Fosforilación de proteínas plaquetarias	38
4.1.3.1. Cadena ligera de miosina (MLC)	38
4.1.3.2. Proteína de 47 kDa (P-47)	39
4.1.5. Ensamblaje del citoesqueleto	39
4.2. Activación plaquetaria por otras vías	41
5.- METABOLISMO DEL ACIDO ARAQUIDONICO	41
5.1. Composición y localización de los principales fosfolípidos plaquetarios	42

5.2. Vías de liberación de ácido araquidónico	42
5.2.1. Vía Diglicérido-lipasa/Monoglicérido-lipasa	42
5.2.2. Vía Fosfolipasa-A ₂	43
5.3. Metabolismo de ácido araquidónico en plaquetas	46
5.3.1. Vía Lipooxigenasa	48
5.3.2. Vía Ciclooxygenasa	48
6.- MECANISMOS DE REGULACION DE LAS RESPUESTAS PLAQUETARIAS	50
6.1. Mecanismos de regulación positiva	50
6.1.1. Sistemas de retroalimentación-positiva	50
6.1.2. Acción sinérgica de los agonistas	51
6.2. Mecanismos de regulación negativa	51
6.2.1. AMP cíclico	51
6.2.2. Proteína-Quinasa-C	51
<u>MATERIALES Y METODOS</u>	53
1. MATERIALES	53
1.1. Material Biológico	53
1.2. Productos Radiactivos	
1.3. Lípidos	53
1.4. Material para cromatografía	53
1.5. Material para autorradiografía	53

1.6. Otros reactivos y materiales	54
1.6.1. Material plástico	54
1.6.2. Bolsas para extracción de sangre	54
1.6.3. Otros reactivos químicos	54
1.7. Equipo	55
2. METODOS	56
2.1. Aislamiento de plaquetas sanguíneas	56
2.2. Recuento de plaquetas y valoración de su viabilidad	57
2.3. Incubación y estimulación de plaquetas	57
2.4. Permeabilización de plaquetas	58
2.5. Determinación de la secreción de serotonina	58
2.6. Extracción de lípidos totales	59
2.7. Aislamiento de lípidos de hígado de rata	59
2.8. Separación de lípidos	60
2.9. Autorradiografía	63
2.10. Aislamiento y separación de Inositoles-Fosfato	63
2.11. Determinación de la radiactividad	65
2.12. Procesamiento de muestras para Microscopía electrónica	65
2.13. Curvas de agregación	66
<u>RESULTADOS</u>	67
1.- SECRECION PLAQUETARIA INDUCIDA POR AGONISTAS FISIOLÓGICOS Y AFISIOLÓGICOS	67
1.1. Efecto de la trombina sobre la secreción plaquetaria	67
1.2. Efecto del ionóforo cálcico A23187 sobre la secreción plaquetaria	68

1.3. Efecto del calcio extracelular sobre la secreción plaquetaria	69
1.3.1. Secreción inducida por calcio	69
1.3.2. Efecto del calcio sobre la secreción inducida por trombina	69
1.3.3. Efecto del calcio sobre la secreción inducida por ionóforo A23187	69
1.4. Efecto de agonistas activadores de proteínas-G-reguladoras sobre la secreción plaquetaria	70
1.4.1. Efecto del Fluoruro sódico (NaF) sobre la secreción plaquetaria	70
1.4.1.1. Efecto del NaF sobre la secreción inducida por trombina	70
1.4.2. Efecto del GTP γ S sobre la secreción plaquetaria	71
1.5. Efecto del ATP sobre la secreción plaquetaria	72
1.6. Efecto del 1,2-Oloacetilglicerol sobre la secreción plaquetaria	73
2.- EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE DISTINTAS RUTAS METABOLICAS CELULARES SOBRE LA SECRECION PLAQUETARIA	73
2.1. Efecto de la Neomicina sobre la secreción plaquetaria inducida por distintos agonistas	73
2.1.1. Secreción inducida por trombina	74
2.1.2. Secreción inducida por ionóforo cálcico A23187	74
2.1.3. Secreción inducida por Fluoruro sódico	74
2.1.4. Secreción inducida por GTP γ S	74
2.1.5. Secreción inducida por 1,2-Oloacetilglicerol	75
2.2. Efecto de la Quinacrina sobre la secreción plaquetaria inducida por distintos agonistas	75
2.2.1. Secreción inducida por trombina	75
2.2.2. Secreción inducida por ionóforo cálcico A23187	75
2.2.3. Secreción inducida por Fluoruro sódico	76
2.2.4. Secreción inducida por 1,2-Oloacetilglicerol	76
2.3. Efecto de la Indometacina sobre la secreción plaquetaria inducida por distintos agonistas	76
2.3.1. Secreción inducida por trombina	76
2.3.2. Secreción inducida por ionóforo cálcico A23187	77
2.3.3. Secreción inducida por Fluoruro sódico	77

3.-	METABOLISMO DE POLIFOSFOINOSITIDOS EN PLAQUETAS CANINAS	77
3.1.	Hidrólisis de PtdIns(4,5)P ₂ y PtdIns(4)P en plaquetas activadas por trombina	77
3.1.1.	Efecto de la quinacrina sobre la hidrólisis de polifosfoinosítidos	78
3.1.1.1.	Hidrólisis de polifosfoinosítidos inducida por trombina	78
3.1.1.2.	Hidrólisis de polifosfoinosítidos inducida por ionóforo cálcico A23187	78
3.1.1.3.	Hidrólisis de polifosfoinosítidos inducida por Fluoruro sódico	79
3.2.	Producción de 1,2-Diacilglicerol en plaquetas activadas por trombina	79
3.2.1.	Producción de 1,2-Monoacilglicerol en plaquetas estimuladas por trombina	80
3.3.	Producción de Inositoles-fosfato en plaquetas estimuladas por trombina	80
4.-	PRODUCCION DE ACIDO FOSFATIDICO EN PLAQUETAS ESTIMULADAS POR DISTINTOS AGONISTAS	81
4.1.	Producción de Ptd-OH en plaquetas activadas por trombina	81
4.1.2.	Plaquetas intactas	81
4.1.3.	Plaquetas permeabilizadas	82
4.2.	Producción de Ptd-OH en plaquetas activadas por ionóforo A23187	82
4.2.2.	Plaquetas intactas	82
4.2.3.	Plaquetas permeabilizadas	82
4.3.	Producción de Ptd-OH en plaquetas activadas por Fluoruro sódico	83
4.4.	Producción de Ptd-OH en plaquetas activadas por 1,2-Oloacetilglicerol	83
4.5.	Efecto de la Neomicina sobre la formación de Ptd-OH inducida por distintos agonistas	83
4.5.1.	Estimulación con trombina	83
4.5.2.	Estimulación con ionóforo A23187	84
4.5.3.	Estimulación con Fluoruro sódico	84

4.6. Efecto de la Quinacrina sobre la producción de Ptd-OH inducida por distintos agonistas	84
4.6.1. Estimulación con trombina	84
4.6.2. Estimulación con ionóforo A23187	84
4.6.3. Estimulación con Fluoruro sódico	85
5.- FOSFOLIPIDOS DE MEMBRANA PLAQUETARIOS	85
5.1. Fosfolípidos en plaquetas en reposo	85
5.2. Fosfolípidos en plaquetas estimuladas	86
5.2.1. Plaquetas estimuladas por trombina	86
5.2.2. Plaquetas estimuladas por ionóforo A23187	87
5.2.3. Plaquetas estimuladas con Fluoruro sódico	87
5.3. Efecto de la quinacrina sobre el metabolismo de los fosfolípidos en plaquetas activadas por distintos agonistas	88
5.3.1. Plaquetas estimuladas por trombina	88
5.3.2. Plaquetas estimuladas por ionóforo A23187	88
5.3.3. Plaquetas estimuladas con Fluoruro sódico	88
5.4. Efecto de la Neomicina sobre el metabolismo de los fosfolípidos en plaquetas activadas por Fluoruro sódico	90
6.- MOVILIZACION Y METABOLISMO DE ACIDO ARAQUIDONICO	90
6.1. Movilización de ácido araquidónico (20:4) en plaquetas activadas	90
6.1.1. Estimulación con trombina	90
6.1.2. Estimulación con ionóforo cálcico A23187	90
6.1.3. Estimulación con Fluoruro sódico	91
6.1.4. Estimulación con Oloacetilglicerol	91
6.2. Metabolismo de 20:4 en plaquetas activadas	91
6.2.1. Estimulación con trombina	92
6.2.2. Estimulación con ionóforo cálcico A23187	92
6.3. Efecto de la neomicina sobre la liberación de 20:4 inducida por distintos agonistas	93

6.3.1. Plaquetas estimuladas con trombina	93
6.3.2. Plaquetas estimuladas con ionóforo A23187	93
6.3.3. Plaquetas estimuladas con Fluoruro sódico	93
6.4. Efecto de la Quinacrina sobre la liberación de 20:4 inducida por distintos agonistas	94
6.4.1. Estimulación con trombina	94
6.4.2. Estimulación con ionóforo A23187	94
6.4.3. Estimulación con Fluoruro sódico	94
7.- EFECTO DE LA ALBUMINA DE SUERO BOVINO SOBRE LA ACTIVACION PLAQUETARIA	95
7.1. Efecto de la BSA sobre la secreción plaquetaria	95
7.1.1. Secreción plaquetaria basal	95
7.1.2. Secreción plaquetaria inducida por trombina	95
7.1.3. Secreción plaquetaria inducida por ionóforo A23187	95
7.1.3.1. Secreción en presencia de Calcio	95
7.1.3.2. Secreción en ausencia de Calcio	96
7.2. Efecto de la BSA sobre la formación de Ptd-OH	97
7.2.1. Plaquetas estimuladas por trombina	97
7.2.2. Plaquetas estimuladas por ionóforo A23187	97
7.3. Efecto de la BSA sobre la liberación de 20:4	97
7.3.1. Plaquetas estimuladas por trombina	97
7.3.2. Plaquetas estimuladas por ionóforo A23187	98
7.4. Efecto de la BSA sobre el metabolismo de 20:4	98
7.4.1. Plaquetas estimuladas por trombina	98
7.4.2. Plaquetas estimuladas por ionóforo A23187	98
8. ULTRAESTRUCTURA DE LAS PLAQUETAS CANINAS	99
8.1. Plaquetas en reposo	99
8.2. Plaquetas activadas	99

<u>DISCUSION</u>	106
1.- EFECTO DE LA ALBUMINA DE SUERO BOVINO SOBRE LA ACTIVACION PLAQUETARIA INDUCIDA POR TROMBINA Y IONOFORO CALCICO A23187	106
2.- TRANSDUCCION DE SEÑALES EN PLAQUETAS CANINAS	108
2.1. Metabolismo de Fosfoinosítidos y formación de Diacilglicerol en plaquetas activadas	109
2.2. Formación de Ptd-OH en plaquetas activadas	111
2.3. Movilización y metabolismo de ácido araquidónico en plaquetas activadas	112
2.4. Participación de Proteínas-G-reguladoras en la activación plaquetaria	115
2.5. Participación de distintas rutas metabólicas en los fenómenos de secreción plaquetaria	117
2.5.1. Hidrólisis de Polifosfoinosítidos	118
2.5.2. Metabolismo de 20:4	118
2.5.3. Proteínas-G-reguladoras	119
<u>CONCLUSIONES</u>	122
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	123

IMPORTANCIA DEL TEMA

El estudio de las bases moleculares de los fenómenos de activación celular se ha convertido en los últimos años en una de las líneas de investigación prioritarias dentro del área de la biología celular. Uno de los sistemas celulares que con mayor frecuencia se ha utilizado en este campo de investigación han sido las plaquetas sanguíneas, ya que estas células poseen la capacidad de activarse como consecuencia de su interacción con una gran variedad de estímulos externos, experimentando diversos cambios estructurales y metabólicos que inducirán las clásicas respuestas plaquetarias de activación: cambio de forma, adhesión, secreción y agregación. Los mecanismos moleculares implicados en estas respuestas de activación plaquetarias son numerosos y complejos, incluyendo flujos de calcio, fosforilaciones protéicas, oxigenación del ácido araquidónico, estimulación del metabolismo de ciertos fosfolípidos y otros sistemas poco conocidos hasta el momento. La gran diversidad de rutas metabólicas que resultan activadas tras el contacto con los agonistas específicos, y el hecho de que la mayoría de ellas sean compartidas por otros muchos tipos celulares, convierten a las plaquetas en un modelo ideal para el estudio de los sistemas implicados en los fenómenos de activación.

Por estos motivos, hemos escogido el estudio de las bases moleculares de la activación plaquetaria como tema de nuestra tesis doctoral, centrando nuestra atención en la cadena de sucesos que conducen a la reacción de secreción en estas células. Con este objeto, hemos centrado nuestro trabajo en el estudio del metabolismo de polifosfoinosítidos y ácido araquidónico y en su posible implicación en los procesos de secreción plaquetaria. Nuestro objetivo principal ha consistido en esclarecer el grado de participación de estas rutas metabólicas en los fenómenos de secreción, tratando asimismo de evidenciar la posible existencia de vías alternativas para la activación plaquetaria, tema que ha despertado un gran interés en los últimos años.

Por otra parte, la constatación de que la bibliografía referente a la fisiología plaquetaria del perro era prácticamente inexistente, nos llevó a escoger esta especie para llevar a cabo nuestro trabajo, ya que consideramos importante y necesario profundizar en el estudio de la funcionalidad plaquetaria de una de las especies animales que con mayor frecuencia es utilizada en los modelos experimentales de múltiples enfermedades.

Finalmente, desde el punto de vista veterinario, consideramos que el estudio de los mecanismos de activación de las plaquetas caninas puede resultar de gran ayuda para llegar a comprender mejor la etiopatogenia de múltiples procesos que cursan con posibles alteraciones funcionales de estas células y que con frecuencia se presentan en la clínica veterinaria (coagulopatías de etiología diversa, diatesis hemorrágicas asociadas a otras enfermedades primarias, etc). Por este motivo, y teniendo en cuenta que por lo general el veterinario no está familiarizado con los aspectos bioquímicos y moleculares de la funcionalidad plaquetaria, hemos creído conveniente realizar una revisión bibliográfica exhaustiva en la cual se describen ampliamente los principales mecanismos implicados en los fenómenos de activación de estas células.

OBJETIVOS DEL TRABAJO

Al plantearnos el presente trabajo, y considerando los argumentos expuestos en el apartado anterior, nos propusimos un objetivo fundamental:

1º.- Estudio de la participación del metabolismo de polifosfoinosítidos en la secreción de serotonina inducida por agonistas fisiológicos (trombina) y afisiológicos (ionóforo cálcico A23187) en plaquetas caninas.

Queremos reseñar asimismo que a medida que nuestro trabajo fue avanzando, fue adquiriendo cada vez más importancia otro parámetro de activación sobre el cual no pudimos encontrar información en la bibliografía consultada, por lo que su estudio se convirtió en un segundo objetivo de nuestro trabajo:

2º.- Estudio de las vías de liberación de ácido araquidónico en plaquetas caninas estimuladas por diversos agonistas.

De esta forma hemos pretendido, por un lado, contribuir al mejor conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en los fenómenos de secreción celular, y por otro, profundizar en el estudio de la funcionalidad de las plaquetas caninas, esclareciendo algunos aspectos de sus vías de activación que hasta el momento no habían sido descritos.

INTRODUCCION

1. PAPEL DE LAS PLAQUETAS EN PROCESOS FISIOLÓGICOS Y PATOLÓGICOS

Las plaquetas son células sanguíneas anucleadas, producidas por la fragmentación de los megacariocitos de la médula ósea.

El número normal de plaquetas circulantes en el perro oscila entre 150.000-500.000/ μ l, con un volumen medio de 7.3-8.3 fl. La vida media de las plaquetas en esta especie es de unos 6-9 días, permaneciendo en condiciones normales un 30% del total de plaquetas secuestradas a nivel del bazo. Una vez cumplido su período vital, las plaquetas serán destruidas por las células del sistema retículo endotelial del bazo, hígado y médula ósea (1,2).

La función principal de las plaquetas consiste en participar en el fenómeno de la hemostasia. La hemostasia es el complejo proceso fisiológico a través del cual se previenen y controlan las extravasaciones de sangre a partir de vasos lesionados mediante la formación de parches estables de fibrina. En la hemostasia están implicados tres sistemas principales que interactúan entre sí : la pared vascular, las plaquetas sanguíneas, y los factores solubles que participan en la cascada de la coagulación.

La participación de las plaquetas en la hemostasia comprende su adhesión al subendotelio, la secreción o síntesis de determinados compuestos vasoconstrictores, y su agregación final para formar un auténtico parche plaquetario que evita mecánicamente la extravasación de sangre.

Además de su importante participación en la hemostasia, las plaquetas actúan también como mediadoras en los fenómenos de inflamación y reacciones inmunológicas merced a los compuestos que contienen en sus gránulos citoplasmáticos y a su capacidad para fijar inmunoglobulinas y para activar la cascada del complemento.

Cualquier alteración de la reactividad normal de estas células puede contribuir a la patogénesis de diversas enfermedades o a sus complicaciones tromboembólicas. Entre las múltiples patologías en las que las plaquetas pueden verse involucradas, destacan la trombosis y aterosclerosis, las complicaciones vasculares de la diabetes mellitus, la cardiopatía isquémica, alteraciones renales como el síndrome nefrótico y las glomerulonefritis, y las reacciones de rechazo a los órganos trasplantados (2,3,4,5,6).

2. RESPUESTAS PLAQUETARIAS DE ACTIVACION

Una característica fundamental de estas células radica en su capacidad de respuesta frente a una gran variedad de estímulos externos. Tras ser estimuladas, las plaquetas experimentan una serie de cambios morfológicos y metabólicos que incluyen básicamente fenómenos de adhesión y cambio de forma, seguidos de agregación y secreción (7).

Existe un gran número de agentes capaces de inducir este tipo de respuestas en las plaquetas, incluyendo compuestos tan diferentes como proteasas (trombina), proteínas estructurales (colágeno), fosfolípidos (platelet-activating-factor, PAF) y muchos otros de difícil clasificación. Sin embargo, a pesar de esta gran heterogeneidad, todos los agonistas plaquetarios fisiológicos comparten una característica común dentro de sus mecanismos de acción: la unión a receptores específicos sobre la superficie plaquetaria. La señal emitida por los receptores activados será transducida a través de la membrana plasmática dando lugar a la estimulación y regulación de determinados sistemas efectores ; al activarse, estos sistemas efectores modularán los niveles de una serie de mensajeros intracelulares que serán los que finalmente desencadenen las respuestas plaquetarias (Fig. 1)

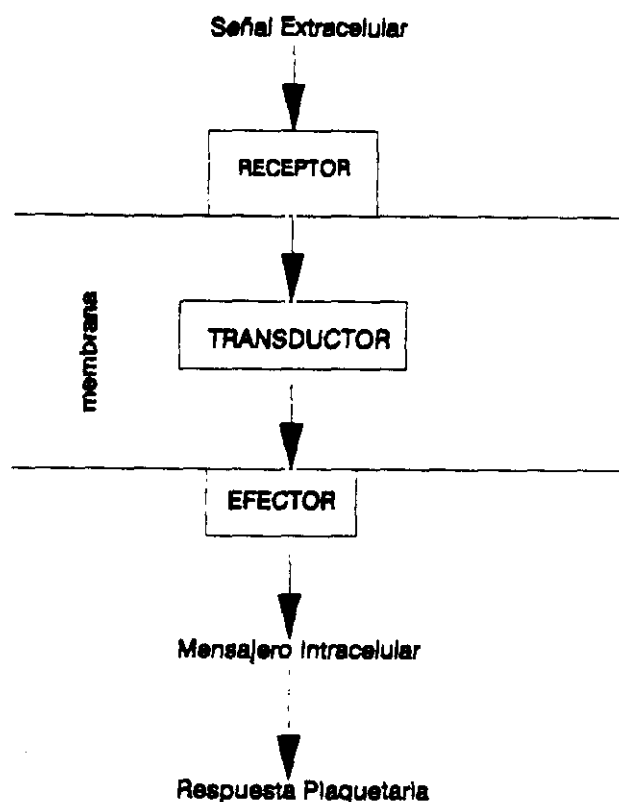


FIG. 1. TRANSFORMACION DE SEÑALES EXTRACELULARES EN RESPUESTAS CELULARES

Las respuestas de activación que experimentan las plaquetas tras el contacto con un estímulo, pueden agruparse en dos grandes categorías:

2.1.- Respuestas reversibles

En este grupo se incluyen:

- Adhesión
- Cambio de forma
- Agregación primaria reversible

2.2.- Respuestas irreversibles

- Incluyen:
- Secreción
 - Agregación secundaria irreversible

No se conoce con exactitud la finalidad de las reacciones de tipo reversible, si bien es probable que puedan estar asociadas con ciertas funciones plaquetarias relacionadas con el mantenimiento de la integridad de la pared vascular (8,9).

Las respuestas de tipo irreversible están implicadas fundamentalmente en los fenómenos de hemostasia y coagulación, así como en numerosos procesos patológicos, como la cardiopatía isquémica por obliteración de los vasos sanguíneos coronarios y otras complicaciones tromboembólicas de etiología diversa.

2.1.- Respuestas reversibles

2.1.1.- Adhesión

La adhesión y el cambio de forma son las primeras respuestas plaquetarias frente a los estímulos fisiológicos. Cualquier lesión vascular que conlleve la exposición del subendotelio, inducirá la inmediata adhesión de las plaquetas a este último mediante la interacción de dos macroproteínas específicas: el colágeno y el factor de von Willebrand (vWF) (10,11).

El vWF actúa de "puente" entre las plaquetas y el colágeno subendotelial, uniéndose mediante distintos dominios de su molécula por un lado a un receptor de membrana plaquetario (Glicoproteína Ib), y por otro a las fibras de colágeno subendotelial (12,13,14). La intervención del vWF es esencial para que se pueda producir eficazmente la adhesión de las plaquetas a la pared vascular; las plaquetas de pacientes con enfermedad de von Willebrand (niveles disminuidos de vWF), y las procedentes de enfermos con síndrome de Bernard-Soulier (ausencia del receptor para vWF), muestran una capacidad de adhesión al subendotelio muy reducida (10,15).

2.1.2.- Cambio de forma ("Shape-Change")

Como consecuencia de su activación, las plaquetas experimentan una serie de cambios morfológicos hasta adoptar un aspecto característico que las diferencia de las células en reposo (16).

2.1.2.1.- Estructura de las plaquetas en reposo

Las plaquetas en reposo poseen un contorno discoide, mantenido por un potente haz de microtúbulos dispuesto a manera de circunferencia inmediatamente por debajo de la membrana plasmática (17).

Estas células presentan múltiples organelas dispersas por el citoplasma, siendo las más abundantes los gránulos de almacenamiento, que se clasifican en 4 grupos atendiendo a sus características ultraestructurales, contenido y densidad electrónica; entre ellos se encuentran los α -gránulos, gránulos densos, lisosomas y microperoxisomas.

a) α - gránulos:

Los α -gránulos son las organelas intraplaquetarias más abundantes; tienen un diámetro aproximado de 300-500 nm, con una forma oval o esférica, y vistos al microscopio electrónico presentan un nucleóide de densidad moderada incluido dentro de una matriz difusa y ligeramente granular.

Estos gránulos contienen numerosas proteínas implicadas en fenómenos de inflamación, coagulación y cicatrización de heridas, entre las cuales se incluyen:

- Proteínas adhesivas:
 - Fibrinógeno
 - Fibronectina
 - Trombospondina
 - vWF
- Factores quimiotácticos
- Factores de crecimiento:
 - Factor de crecimiento plaquetario (PDGF)
 - Factor de crecimiento transformante- β (TGF- β)
- Factores antiheparínicos:
 - Factor plaquetario-4 (PF-4)
 - β -Tromboglobulina (β -TG)

b) gránulos densos :

Los gránulos densos son menos numerosos y más pequeños que los α -gránulos, con un diámetro que puede oscilar entre 200-300 nm. Son las organelas más electro-densas en plaquetas tratadas con osmio, presentando una zona oscura central rodeada por un halo más claro.

Los gránulos densos contienen fundamentalmente:

- Nucleótidos de Adenina (ATP, ADP) implicados en el metabolismo plaquetario y en los fenómenos de hemostasia.
- Aminas vasoactivas (Histamina y serotonina)
- Cationes bivalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+})

c) Lisosomas:

Los lisosomas son pequeñas vesículas de 175-250 nm de diámetro, que solamente son visibles utilizando técnicas especiales de tinción, y que contienen diversas enzimas proteolíticas (fosfatasas ácidas, aril-sulfatasa, etc).

d) Microperoxisomas:

Los microperoxisomas intraplaquetarios son muy pequeños y escasos, siendo la catalasa su constituyente mayoritario.

Además de los gránulos, las plaquetas poseen también otras organelas citoplasmáticas entre las que se encuentran mitocondrias, pequeños gránulos de glucógeno que sirven como reserva energética, y una formación membranosa que deriva directamente del Retículo Endoplásmico Liso del Megacariocito, y que recibe el nombre de **Sistema tubular denso (DTS)**. La misión principal del DTS consiste en mantener secuestrado el calcio intracelular en las plaquetas en reposo, localizándose además en su membrana importantes actividades enzimáticas (fosfolipasas, ciclooxigenasa) que serán estimuladas durante las fases de activación celular.

La membrana plasmática de las plaquetas en reposo presenta una superficie homogénea y lisa, con pequeños orificios correspondientes a las aperturas de los canales del **Sistema Canalicular Abierto (OCS)**; el OCS está constituido por invaginaciones de la membrana plasmática, que se difunden por todo el citoplasma plaquetario, facilitando así la liberación del contenido de los gránulos durante la reacción de secreción (16). No obstante, las plaquetas de los bóvidos carecen de OCS, por lo que su mecanismo de secreción puede ser distinto al de otras especies (18).

2.1.2.2.- Estructura de plaquetas activadas

Al ser estimuladas, las plaquetas experimentan cambios morfológicos característicos ("Cambio de forma"); pocos segundos después de contactar con el agonista, las células pierden su clásico contorno discoide y adoptan una forma esférica, al mismo tiempo que comienzan a emitir numerosos y largos pseudópodos. La membrana plasmática se torna irregular y presenta protusiones amorfas (19).

Estos cambios de la superficie externa plaquetaria se acompañan también de movimientos de las organelas citoplasmáticas, que se desplazan hacia el centro de la célula como consecuencia de la contracción de la banda circunferencial de microtúbulos (20,21).

En plaquetas plenamente activadas, todas las organelas aparecen completamente agrupadas en la zona central de la célula, rodeadas íntimamente por un potente anillo de microtúbulos y microfilamentos que continuará cerrándose cada vez más, hasta que el contenido de los gránulos secretores sea liberado a través de los canales del OCS durante la reacción de secreción (16).

Todos los estimulantes plaquetarios inducen un Cambio de Forma completo, excepto la epinefrina y los ésteres de forbol (22,23).

El Cambio de Forma experimentado por las plaquetas activadas es totalmente independiente de los cationes extracelulares (Ca^{2+} , Mg^{2+}), y puede ser inducido sin que se produzcan posteriormente agregación y secreción si se utilizan concentraciones bajas de agonistas (24,25).

En la Fig. 2 se representa esquemáticamente la estructura de una plaqueta canina en reposo (corte transversal), pudiéndose apreciar su contorno discoide y las distintas organelas citoplasmáticas.

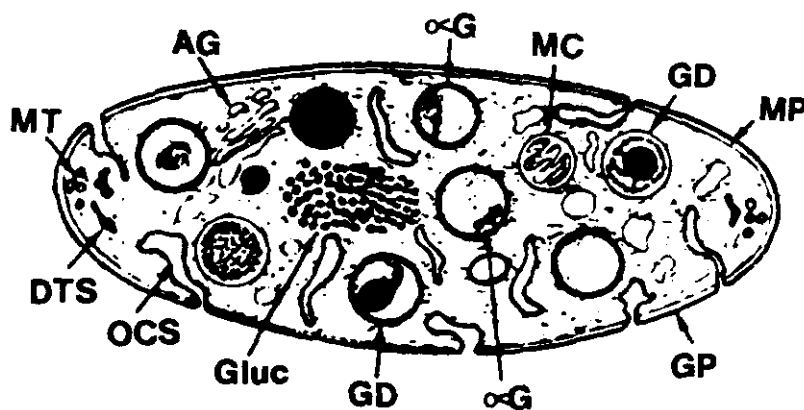


FIG. 2. ESTRUCTURA DE UNA PLAQUETA EN REPOSO (corte transversal)

MP: Membrana plasmática, GD: Gránulos densos, MC: Mitocondrias, αG: Gránulos-α, AG: Aparato de Golgi, MT: Microtúbulos, DTS: Sistema Tubular Denso, OCS: Sistema Canalicular Abierto, Gluc: Gránulos de glucógeno, GP: Cubierta Glicoprotéica.

2.1.3.- Agregación

Por lo general, se pueden distinguir dos fases distintas dentro de la agregación plaquetaria (26,27).

a) La primera onda de agregación o agregación primaria, que es reversible y tiene lugar sin que se produzca la reacción de secreción, y

b) La segunda onda de agregación o agregación secundaria, que ya es irreversible y va siempre asociada a la secreción plaquetaria.

2.1.3.1.- Agregación primaria

La agregación primaria, reversible, puede ser inducida por concentraciones bajas de estimulantes plaquetarios, siempre en presencia de Ca^{2+} y/o Mg^{2+} (28) (solamente concentraciones elevadas de agonistas muy potentes como la trombina son capaces de inducir la agregación en ausencia de calcio extracelular (24)). En estas condiciones, cuando el agonista es débil o su concentración es baja, la agregación plaquetaria será reversible, es decir, que al cesar el estímulo se disociarán las plaquetas que estaban englobadas en los agregados, retornando las células a su estado de reposo original.

La agregación y desagregación de las plaquetas, va asociada a la unión y disociación de fibrinógeno a sus receptores sobre la superficie plaquetaria (un complejo formado por las Glicoproteínas IIb/IIIa) (29,30); para que se pueda producir la agregación, es necesario que estos receptores sean expuestos en la membrana plasmática (cosa que sólo sucede en plaquetas activadas) (30), y que el fibrinógeno se una a ellos en presencia de cationes divalentes (31,32). Parece que la unión de estos últimos (Ca^{2+} ó Mg^{2+}) al complejo Gp IIb/IIIa, regula la orientación de este receptor sobre la superficie plaquetaria, haciendo posible su interacción con el fibrinógeno (33,34).

2.2.- Respuestas irreversibles

2.2.1. Agregación

2.2.1.1.- Agregación secundaria

La agregación secundaria, ya irreversible, es una consecuencia directa de la reacción de secreción; en otras palabras, lo que transforma la agregación plaquetaria reversible en irreversible, es precisamente el proceso de secreción; una vez que las plaquetas ya han liberado el contenido de sus gránulos al medio extracelular, la agregación será completamente irreversible.

Así, la formación de grandes agregados plaquetarios irreversibles, está mediada por el ADP y Ca^{2+} secretados a partir de los gránulos densos (35), las proteínas adhesivas (incluyendo fibrinógeno, fibronectina, trombospondina y vWF) liberadas de los α -gránulos

(36,37), y por los endoperóxidos cíclicos y Tromboxano-A₂ formados a partir del ácido araquidónico liberado en el interior de las células tras la activación (38).

La posibilidad de medir la agregación plaquetaria in-vitro, ha contribuido de forma importante al mejor conocimiento de la funcionalidad de estas células. En 1962, Born (39) y O'Brien (40) describieron una técnica fotométrica sencilla que permitía cuantificar la agregación plaquetaria: estos autores observaron que cuando se añadía un agonista a una suspensión de plaquetas en agitación, la transmitancia de luz a través de la muestra aumentaba proporcionalmente al grado de agregación de las plaquetas. Mediante este sencillo método, es posible medir la agregación plaquetaria en respuesta a una gran diversidad de agonistas, pudiendo incluso diferenciarse las dos ondas de agregación (reversible e irreversible). Con esta misma técnica, se puede detectar también el cambio de forma experimentado por las plaquetas antes de la agregación, ya que la esferización de su contorno provoca un descenso transitorio de la transmitancia que aparece reflejado en la curva de agregación.

En la Fig. 3 aparecen representadas algunas curvas de agregación plaquetaria registradas con los agregómetros ópticos convencionales, en las que se pueden apreciar el cambio de forma y las dos fases de la agregación.

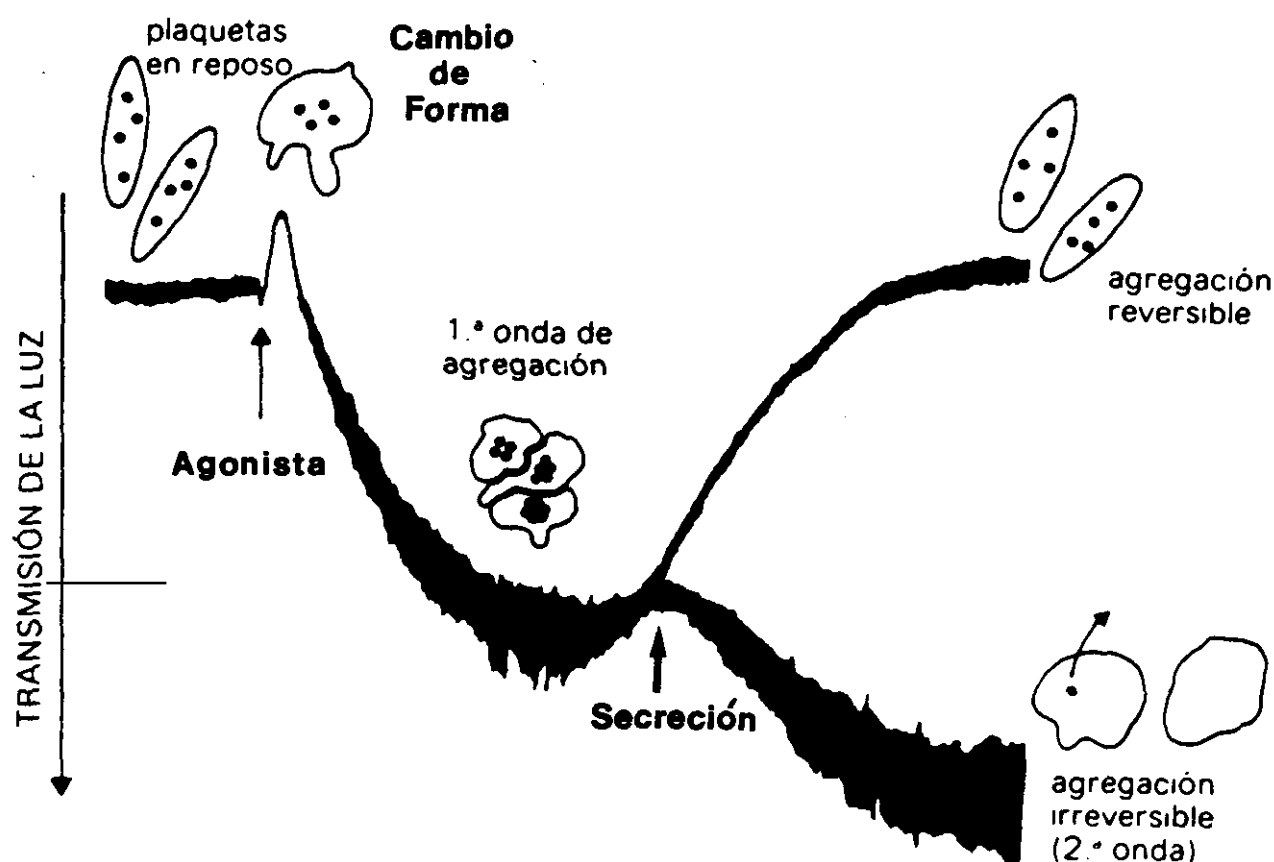


FIG. 3. CURVAS DE AGREGACION PLAQUETARIA

2.2.2.- Secreción ("Release Reaction")

El proceso de secreción plaquetaria consiste en la liberación al medio extracelular del contenido de los α -gránulos, gránulos densos y lisosomas (35).

La secreción a partir de los α -gránulos y gránulos densos puede ser inducida por cualquier agonista plaquetario, pero solamente altas concentraciones de trombina o colágeno son capaces de estimular la secreción de los lisosomas (41).

Se han propuesto dos mecanismos diferentes de secreción plaquetaria;

- uno de ellos consiste en la centralización de los gránulos y su posterior fusión con los canales del OCS para seguidamente liberar su contenido al exterior de la célula (42,43).

- el segundo mecanismo, descrito más recientemente, consiste en el desplazamiento de los gránulos hacia la periferia celular, dando lugar a la formación de estructuras multivesiculares asociadas a la membrana, que posteriormente se disociarán, vertiendo su contenido al medio extracelular (44).

De esta forma, durante la reacción de secreción plaquetaria se liberan al espacio extracelular los compuestos contenidos en los gránulos citoplasmáticos, cuya misión principal consiste en potenciar la activación de la plaqueta original y al mismo tiempo transmitir la señal de estimulación a las células vecinas.

3. AGONISTAS PLAQUETARIOS FISIOLÓGICOS

Se consideran agonistas plaquetarios fisiológicos aquellos agentes que están presentes en el organismo en condiciones fisiológicas y que son capaces de inducir respuestas plaquetarias.

El número de agonistas plaquetarios descritos hasta el momento es realmente elevado, desconociéndose en la mayoría de los casos el papel fisiológico que desempeñan muchos de ellos.

3.1.- Clasificación:

Los agonistas plaquetarios se dividen en débiles y fuertes, atendiendo a sus requerimientos para inducir una activación plaquetaria completa; estos requerimientos se refieren principalmente a:

1. Presencia de cationes extracelulares
2. Necesidad de que se haya producido la primera onda de agregación
3. Existencia de actividad ciclooxigenasa, con formación de metabolitos oxigenados activos del ácido araquidónico (endoperóxidos cíclicos y Tromboxano A_2)

Los agonistas débiles solamente podrán inducir una activación plaquetaria completa (secreción y agregación irreversible), cuando se cumplan estos tres requisitos.

Por el contrario, los agonistas fuertes son capaces de inducir secreción y agregación irreversible en ausencia de cationes extracelulares y de metabolitos del ácido araquidónico, y sin necesidad de que se haya producido previamente una agregación primaria.

Existen también una serie de agonistas de potencia intermedia, que pueden producir secreción sin agregación previa y sin formación de metabolitos del ác. araquidónico, aunque la inhibición de la ciclooxygenasa y la eliminación del ADP reducen significativamente la secreción inducida por este grupo de agonistas.

Dentro de los agonistas débiles se incluyen el ADP y la epinefrina, mientras que los agonistas fuertes por excelencia son la trombina y el colágeno; los agonistas intermedios están representados fundamentalmente por el PAF, la vasopresina y los análogos de endoperóxidos cíclicos y TxA_2 .

3.2.-Mecanismos de acción

3.2.1. Agonistas débiles e intermedios

3.2.1.1.- ADP

El ADP ejerce dos efectos distintos sobre las plaquetas:

a) * Por un lado induce las clásicas respuestas de activación plaquetaria; las concentraciones bajas de ADP ($0.1-0.5 \mu M$) inducen el cambio de forma, mientras que concentraciones superiores ($1-5 \mu M$) son capaces de estimular la agregación y secreción (45).

b) * Por otra parte, el ADP antagoniza la estimulación de la adenilato-ciclasa inducida por PGE_1 o PGI_2 (concentración de ADP con 50% del efecto máximo (EC_{50}): $3 \mu M$) (46). De esta forma, el ADP reduce los niveles plaquetarios de AMPc, aunque este hecho por sí mismo no es suficiente para inducir la activación celular.

Estas dos acciones del ADP parecen ser procesos completamente independientes entre sí (47). Algunos autores postulan que el ADP produce estos dos efectos a través de dos receptores diferentes (48), mientras que otros (49) piensan que ambos fenómenos están mediados por un único receptor. Los trabajos más recientes (50,51) revelan como modelo más probable para el mecanismo de acción del ADP, la unión de éste a dos lugares distintos dentro de un mismo receptor, aunque dicho receptor no ha podido ser caracterizado aún.

Otro importante efecto del ADP sobre la funcionalidad plaquetaria, consiste en su acción potenciadora sobre la activación inducida por otros agonistas. Se ha demostrado la existencia de este efecto potenciador del ADP en la estimulación inducida por colágeno (52),

análogos de endoperóxidos cíclicos (53), epinefrina (54), fibrinógeno (55) y por concentraciones bajas de trombina (las concentraciones altas de trombina parecen actuar independientemente del ADP) (56).

3.2.1.2.- Epinefrina

Ya en la década de los 60 se demostró que las catecolaminas pueden actuar como estimulantes plaquetarios (57); dentro de ellas, la más potente parece ser la epinefrina. Si bien las concentraciones de epinefrina presentes de forma fisiológica en la circulación sanguínea son mucho menores (0.1 nM) que las necesarias para inducir la activación plaquetaria *in-vitro* ($>0.1 \mu\text{M}$) (58), se ha comprobado que concentraciones relativamente bajas de epinefrina pueden incrementar la respuesta plaquetaria frente a otros agonistas (59,60), por lo que se ha atribuido a la epinefrina un papel como potenciador fisiológico de la activación plaquetaria, especialmente en las situaciones que van asociadas a aumentos de los niveles sanguíneos de esta catecolamina, como por ejemplo en los estados de stress (58).

La epinefrina, al igual que el ADP, ejerce dos acciones distintas sobre las plaquetas; puede actuar como agente agregante o pro-agregante (concentraciones efectivas 0.4-1 μM) (61,62), o bien como inhibidor de la adenilato-ciclasa (0.2-0.7 μM) (61,63).

Ambos efectos son mediados por la activación de receptores α_2 -adrenérgicos (64). El receptor α_2 -adrenérgico de las plaquetas humanas ha sido caracterizado recientemente (65), y se ha demostrado que la unión de la epinefrina a este receptor estimula la actividad GTP-asa de G_i (66) modulando así la actividad adenilato-ciclasa plaquetaria.

3.2.1.3.-PAF (Factor Activador Plaquetario)

El PAF ó PAF-aceter (1-O-alkil-2-O-acetil-*sn*-glicero-3-fosforilcolina) es un potente activador celular, capaz de estimular diferentes tipos celulares entre los que se incluyen las plaquetas, neutrófilos, monocitos, células endoteliales, células musculares lisas, neuronas, y células mesangiales (67). La gran diversidad de células-diana sobre las que puede actuar el PAF, conduce a pensar que probablemente la acción biológica principal de este fosfolípido no es precisamente la activación plaquetaria (a pesar del nombre que ha recibido); no obstante, su capacidad para estimular a las plaquetas al mismo tiempo que a otros tipos celulares constituye un fenómeno de gran interés ya que establece conexiones entre las reacciones alérgicas o inflamatorias y los mecanismos hemostáticos.

El PAF puede ser sintetizado por diversos tipos de células inflamatorias (neutrófilos, basófilos, macrófagos (68) e incluso plaquetas (69,70) como consecuencia de su estimulación.

Existen datos que indican la existencia de receptores específicos para el PAF en plaquetas, si bien todavía no han podido ser caracterizados por completo; algunos autores han detectado en la membrana plasmática plaquetaria una proteína de 180 kDa y otra de 160 kDa

capaces ambas de unirse al PAF (71). Existen numerosas evidencias de que el receptor del PAF está acoplado a una proteína-G análoga a las proteínas-G reguladoras del sistema adenilato-ciclasa (72,73), aunque este punto todavía no ha podido ser confirmado.

Como consecuencia de la unión a su receptor, el PAF induce hidrólisis de polifosfoinosítidos con formación de ácido fosfatídico en plaquetas humanas y de caballos (74,75), provocando también una reducción de los niveles de AMPc al inhibir la adenilato-ciclasa (76).

Hasta hace pocos años se consideraba al PAF como mediador de una "tercera vía" de amplificación de la activación plaquetaria (77,27), pero en la actualidad ha quedado descartada esta posibilidad (78,79).

3.2.1.4.- Vasopresina

La vasopresina, además de actuar fisiológicamente como hormona antidiurética induciendo la retención renal de agua, es un potente activador plaquetario.

Se han descrito dos tipos distintos de receptores para la vasopresina: los receptores V_1 que median sus acciones vasculares y glucogenolíticas, y los receptores V_2 mediadores de la acción antidiurética a nivel renal. Los receptores V_1 están acoplados a la hidrólisis de polifosfoinosítidos y movilización intracelular de calcio (80,81), mientras que los del tipo V_2 inducen la estimulación de la adenilato-ciclasa (82). El receptor plaquetario para la vasopresina es del tipo V_1 vascular (83,84,85), existiendo numerosas evidencias que sugieren su acoplamiento a la proteína-G-reguladora de la hidrólisis de polifosfoinosítidos (86).

3.2.1.5.- Ácido araquidónico, endoperóxidos cíclicos y Tromboxano A_2

Una vez liberado en el interior de las plaquetas estimuladas, el ácido araquidónico (20:4) será transformado en los endoperóxidos cíclicos PGG_2 y PGH_2 (EPs) por acción de la ciclooxygenasa, y posteriormente en Tromboxano- A_2 (TxA_2) por la tromboxano-sintetasa (87,88) (ver apartado 5.3.). Estos metabolitos actúan como potentes activadores plaquetarios, pero son extremadamente lábiles (vida media del TxA_2 = 30sg (88)); todos ellos inducen la secreción y agregación plaquetarias a bajas concentraciones (10-100 nM), siendo el TxA_2 el más potente (89).

Mediante la utilización de análogos estables de estos metabolitos oxigenados activos del ácido araquidónico se ha podido profundizar en el estudio de su mecanismo de acción sobre las plaquetas; éstas parecen poseer en su superficie un receptor común para los endoperóxidos cíclicos y el TxA_2 , designado generalmente como receptor PGH_2/TxA_2 (108), cuya presencia en plaquetas caninas ha sido demostrada por Mais y col. (90).

La PGH_2 y el TxA_2 formados a partir del ácido araquidónico en el interior de las plaquetas activadas, salen al medio extracelular para unirse a sus receptores sobre la superficie plaquetaria. Esta unión a sus receptores específicos media sus efectos biológicos sobre las plaquetas; los trabajos más recientes indican que los receptores $\text{PGH}_2/\text{TxA}_2$ están muy probablemente acoplados a proteínas-G-reguladoras de la hidrólisis de polifosfoinosítidos (91,92).

3.2.2.- Agonistas fuertes

3.2.2.1.- Colágeno

Como consecuencia de cualquier lesión a nivel del endotelio vascular, el colágeno subendotelial quedará expuesto y entrará en contacto con las plaquetas presentes en el torrente circulatorio. Este contacto inducirá inmediatamente la adhesión plaquetaria al subendotelio, coincidiendo la mayoría de los autores en que la estructura de triple hélice del colágeno nativo es absolutamente necesaria para que esta activación plaquetaria se pueda producir (93,94).

Parece que la adhesión de las plaquetas al colágeno tiene lugar en dos fases; durante la primera fase se produce un contacto directo de la membrana plaquetaria con el colágeno subendotelial, mientras que en la segunda fase el contacto está mediado por proteínas adhesivas (principalmente por el factor de von Willebrand y en menor medida por la fibronectina) (94). La primera fase consistiría en un "reconocimiento inicial", mientras que la segunda fase serviría para reforzar y amplificar la adhesión.

La proteína de membrana plaquetaria responsable de la interacción directa inicial con el colágeno parece ser un polipéptido de 168 kDa identificado recientemente como la glicoproteína Ia de la superficie plaquetaria (95,96).

3.2.2.2.- Trombina

La trombina (E.C. 3.4.21.5) es la principal enzima biorreguladora del fenómeno de la hemostasia, participando en este último a todos los niveles: plasmático, celular y vascular (97).

La trombina es la única serina-proteasa del sistema de coagulación capaz de inducir la activación plaquetaria, siendo suficientes concentraciones del orden de 1 nM (100 miliunidades/ml) para desencadenar el cambio de forma, secreción del contenido granular y agregación irreversible. Estos cambios fisiológicos se acompañan también de cambios bioquímicos que incluyen flujos de calcio, síntesis de eicosanoides, activación del metabolismo de fosfoinosítidos y fosforilación de proteínas.

Los mecanismos por los cuales la trombina induce la activación plaquetaria no han podido ser del todo esclarecidos hasta el momento.

Ya en 1967, Davey y col. (98) describieron que para que se pudiera producir la activación plaquetaria era imprescindible que la trombina presentara una actividad proteolítica completa, aunque posteriormente se demostró que la cinética del proceso de activación no se corresponde con una simple reacción de proteólisis (99,100). Estos autores comprobaron que, si bien se requiere trombina proteolíticamente activa para que se produzca la activación, no parece existir una transformación catalítica de la trombina durante este proceso, lo cual sugiere que la interacción trombina/plaqueta se establece por dos mecanismos: por un lado, se produce una clásica reacción enzimática (catalizada por la trombina), y por otro una reacción mediada por receptor (en la cual la trombina actuaría como agonista).

Posteriormente se obtuvieron nuevos datos que apuntaban a la posible existencia de dos vías diferentes de activación plaquetaria por trombina (101): una de estas vías, sensible al pretratamiento de las plaquetas con quimotripsina, parece modular la inhibición de la adenilato-ciclasa. La segunda vía de activación por su parte sería la principal responsable de la estimulación de los flujos de calcio, activación de fosfolipasas y proteína-quinasas, y de las reacciones de secreción y agregación.

Otra evidencia que parece confirmar la existencia de dos mecanismos de activación de las plaquetas por trombina, es el hecho de que ciertas respuestas plaquetarias requieren solamente una exposición breve de las plaquetas a la trombina, mientras que otras requieren la presencia continua de este agonista para ser inducidas (102,103).

Los datos disponibles hasta el momento sugieren que la vía de activación sensible a la quimotripsina corresponde a los procesos que requieren la exposición continuada a la trombina, mientras que la segunda vía podría corresponder a las respuestas de activación que solamente necesitan la ocupación transitoria del receptor.

Estudios recientes sobre la unión de la trombina a la superficie plaquetaria parecen demostrar también que este agonista induce la activación plaquetaria a través de diversos mecanismos. La capacidad que posee la trombina para unirse a las plaquetas intactas fue descrita hace ya muchos años (104,105), aunque no se han podido identificar los puntos de unión hasta hace poco tiempo. En la actualidad, se ha demostrado que la trombina interactúa con la superficie plaquetaria en dos lugares distintos como mínimo: el primero de ellos radica en la glicoproteína Ib de la membrana plasmática plaquetaria (106,107), y el segundo en la glicoproteína V (108,109).

Los trabajos de Harmon y Jamieson (110,111,112) han puesto en evidencia que existen tres tipos de receptores para la trombina sobre la superficie plaquetaria: de alta afinidad (50 receptores/plaqueta, K_d :0.3 nM), de moderada afinidad (1700 rec./plaqueta, K_d :11 nM), y de baja afinidad (590.000 rec./plaqueta, K_d :2900 nM). Sus resultados parecen indicar que los puntos de unión de alta afinidad se localizan en la glicoproteína Ib, la cual actuaría como un receptor clásico que podría ser precisamente el mediador principal de la activación

plaquetaria inducida por la trombina. (La Gp Ib es una proteína integral de membrana, que atraviesa la bicapa lipídica para interactuar con proteínas del citoesqueleto, especialmente con la "actin-binding-protein" (113)).

La segunda interacción específica de la trombina con la superficie plaquetaria está relacionada con la actividad proteolítica de este agonista; como se ha mencionado anteriormente, la trombina es una serina-proteasa capaz de hidrolizar determinados enlaces peptídicos de las proteínas (114). Se ha comprobado que la trombina degrada proteolíticamente un sustrato específico sobre la membrana plaquetaria, la glicoproteína V, con la subsiguiente liberación al medio del fragmento hidrolítico Gp Vb1 (108).

Sin embargo, aunque se hayan podido identificar en las plaquetas estos dos puntos específicos de unión para la trombina, se desconoce todavía en qué medida las interacciones de la trombina con estas dos glicoproteínas están implicadas en los fenómenos de activación plaquetaria. Así, la eliminación de la Gp Ib y la Gp V de la superficie plaquetaria por la acción de distintos compuestos reduce considerablemente el número total de puntos de unión para la trombina, pero no bloquea la capacidad de agregación plaquetaria en respuesta a este agonista; si bien la agregación tarda más tiempo del normal en producirse, su intensidad permanece inalterada (115,116).

Estos datos sugieren que las glicoproteínas Ib y V pueden estar implicadas en la aceleración de la activación inducida por la trombina, pero sin ser esenciales para la inducción de la respuesta. Por consiguiente, es muy probable que la trombina interactúe además con otros puntos de la superficie plaquetaria todavía no identificados.

4. MECANISMOS DE ACTIVACION PLAQUETARIA

4.1.- Activación vía receptor

La activación plaquetaria es un proceso complejo, en el cual están implicados diversos mecanismos que interactúan entre sí. Prácticamente ningún agonista plaquetario puede atravesar la membrana plasmática, por lo cual les resulta imposible alcanzar directamente sus sistemas-diana en el interior de la célula. En consecuencia, la señal emitida por la interacción del agonista con su receptor sobre la superficie plaquetaria, debe ser transmitida de algún modo a los sistemas efectores intracelulares, para lo cual las plaquetas disponen de diversos mecanismos: La activación del receptor como consecuencia de su interacción con el agonista será transducida a través de la membrana plasmática hacia el interior de la célula mediante una **unidad de transducción de la señal**. Seguidamente, la señal será transmitida por **segundos**

mensajeros que pondrán en marcha una serie de **señales intracelulares** para inducir la **fosforilación** de determinadas proteínas plaquetarias y el **ensamblaje del citoesqueleto**, fenómenos que desencadenarán finalmente las respuestas celulares.

4.1.1.- Unidad de transducción de membrana

La unidad de transducción de membrana está integrada por tres componentes principales: en primer lugar el propio **receptor**, que está acoplado a una **proteína-G reguladora** que transmite la señal emitida por el receptor activado al tercer componente de la unidad de transducción, la **fosfodiesterasa específica** que hidroliza el lípido precursor de los segundos mensajeros. (Fig.4):

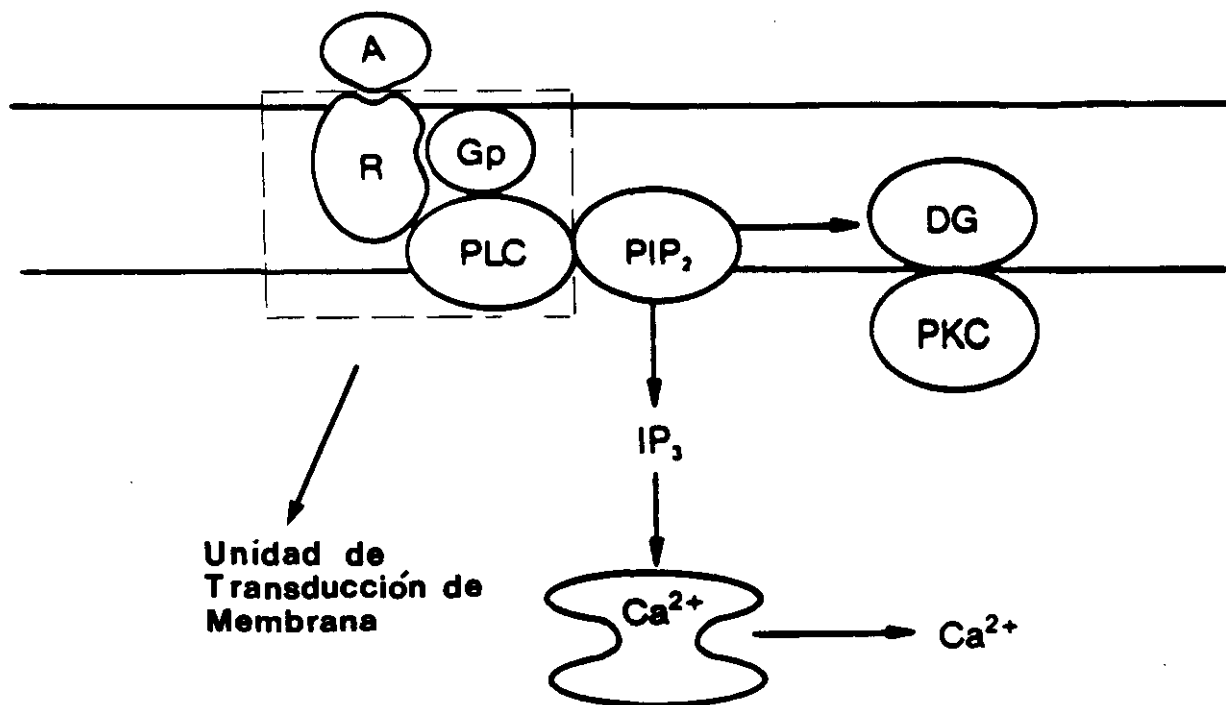


FIG. 4. TRANSDUCCION DE SEÑALES DE ORIGEN EXTRACELULAR

4.1.1.1.- Receptor

La activación plaquetaria es un proceso complejo, que puede ser inducido por una gran variedad de estímulos; en la actualidad, se conocen los puntos de unión sobre la superficie plaquetaria para la mayoría de los agonistas, pero solamente se han podido purificar y caracterizar algunos receptores (Receptores de: Trombina (107,108), Colágeno (95), vWF (14) , Endoperóxidos/TromboxanoA₂ (89,90) , ADP (51) , PAF (71), Vasopresina (84), Epinefrina (65), ver apartado 3.2.).

La unión del agonista a su receptor específico desencadena la activación de este último; esta señal de activación debe ser seguidamente transmitida a través de la membrana plasmática al interior de la célula, proceso que en plaquetas parece estar mediado por proteínas-G-reguladoras (si bien no se excluye la posibilidad de que existan también receptores plaquetarios con capacidad de autofosforilación ya que recientemente se han podido detectar niveles altos de actividad tirosina-quinasa en las membranas de estas células (117,118)).

4.1.1.2.- Proteínas-G-Reguladoras

Las proteínas-G ("Guanine-binding-proteins") constituyen una familia de proteínas reguladoras que actúan como mediadoras de las interacciones entre los receptores de la superficie celular y los efectores intracelulares correspondientes (119).

Originalmente descubiertas por su participación en el metabolismo del AMPc (120), las proteínas-G han ido adquiriendo una gran importancia en los últimos años, habiéndose demostrado su implicación en procesos de transducción de luz (121), movimientos de iones (122,123), posiblemente en el metabolismo del ácido araquidónico (124,125) y muy probablemente también en la hidrólisis de fosfoinosítidos (126,127) y otros fosfolípidos (128,129).

Según el modelo de transducción de la señal propuesto para la activación de la adenilato-ciclase (Fig.5), los receptores de las células en reposo están pre-acoplados a una proteína-G cuya subunidad- α está unida a GDP (a). La unión del agonista con su receptor induce los siguientes cambios estructurales en la proteína-G:

- El GDP unido a la subunidad- α se disocia y es reemplazado por GTP (b); esto ocasiona por un lado un descenso de la afinidad del receptor por el agonista, y por otro la disociación de la proteína-G en sus subunidades- α (activa) y $-\beta/\tau$ (c). La posterior hidrólisis del GTP a GDP (d) induce la reasociación de ambas subunidades, volviendo la proteína-G a su estado inicial (inactivo) (a).

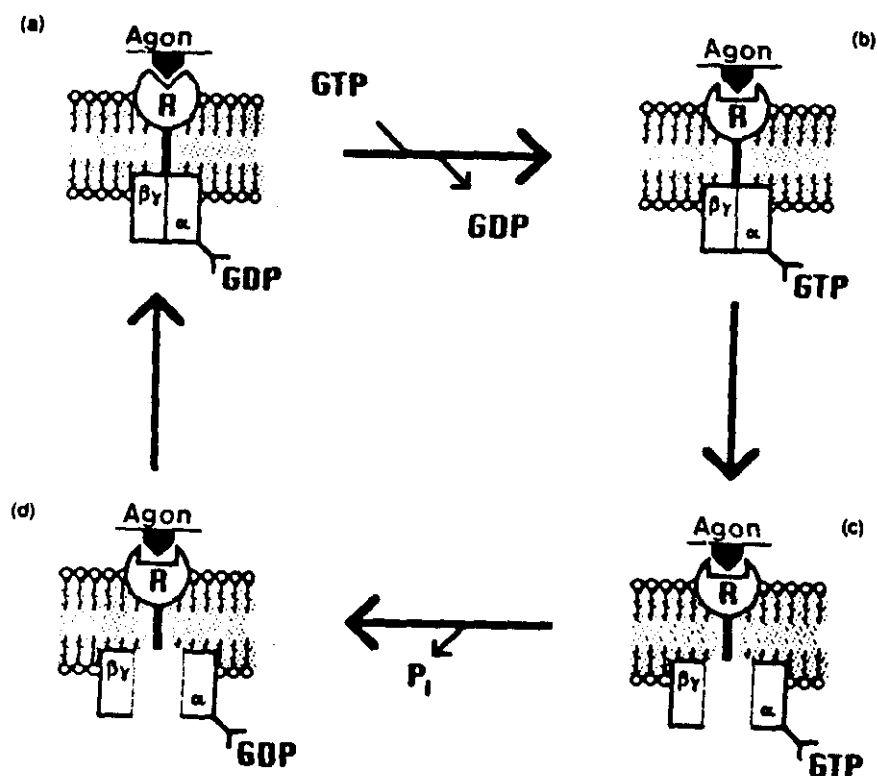


FIG. 5. ACTIVACION DE PROTEINAS-G-REGULADORAS

La mayoría de los receptores plaquetarios muestran al menos dos tipos de afinidades (alta y baja) para sus agonistas. Todo parece indicar que la interacción del agonista con su receptor da lugar a la formación de un complejo de alta afinidad integrado por Agonista/Receptor/Proteína-G ; seguidamente, la unión de GTP a la proteína-G induce su disociación del receptor, convirtiéndose entonces el complejo Agonista/Receptor en un complejo de baja afinidad (119).

4.1.1.2.1.- Proteínas-G en plaquetas

Se ha podido evidenciar la existencia de diversas proteínas-G en plaquetas; Gs (estimulante de la formación de AMPc), Gi (inhibidora de la formación de AMPc), y muy probablemente Gp (activadora de la PLasa-C responsable de la hidrólisis de polifosfoinosítidos). Actualmente se postula también la existencia de una nueva proteína-G reguladora de la actividad PLasa-A₂ plaquetaria ("Gx") (ver apartado 5.2.2.), cabiendo asimismo la posibilidad de que exista en plaquetas una proteína-G-reguladora de la hidrólisis de Fosfatidilcolina.

* Gs media la activación de la adenilato-ciclase, y en plaquetas está acoplada a los receptores de PGI₂/PGE₁, PGD₂, y receptores β-adrenérgicos; la unión de cualquiera de estos compuestos a sus receptores origina una elevación de los niveles intraplaquetarios de AMPc, bloqueando la activación plaquetaria a varios niveles (ver apartado 4.1.2.2.1.).

* Gi es la proteína inhibidora de la adenilato-ciclase, y su estimulación induce un descenso de los niveles de AMPc. En plaquetas, Gi está acoplada a los receptores α-adrenérgicos (receptor para epinefrina) (130), y también al receptor de la trombina (131,132).

La inhibición de la adenilato-ciclase inducida por acción de la epinefrina no ocasiona directamente la activación plaquetaria, por lo que se piensa que la proteína-Gi en plaquetas puede estar acoplada a otros sistemas además de al metabolismo del AMPc, constituidos por ejemplo por canales iónicos (133) u otros mecanismos de activación celular todavía desconocidos.

* Gp es la supuesta proteína estimulante de la actividad PLasa-C de membrana responsable de la hidrólisis de polifosfoinosítidos.

Aunque esta proteína todavía no ha podido ser purificada en plaquetas, existen muchas evidencias que indican su existencia en la membrana plasmática de estas células y su acoplamiento a los receptores para PAF (91), vasopresina (132), trombina (134) y posiblemente TxA₂/Endoperóxidos (92).

* Cada vez son más los autores que sugieren que la hidrólisis de Fosfatidilcolina (PC) inducida por múltiples agonistas en diversos tipos celulares puede participar de manera importante en la transducción de señales, existiendo numerosas evidencias que indican la implicación de proteínas-G-reguladoras en la degradación de este fosfolípido (129). Estudios recientes en plaquetas humanas apuntan la posible participación de estas nuevas proteínas-G en los fenómenos de activación plaquetaria (135).

Considerando en conjunto todo lo expuesto anteriormente, es evidente que existen diversos agonistas plaquetarios cuyas acciones están mediadas por proteínas-G, si bien el receptor para la trombina parece ser el único que está acoplado a dos proteínas-G simultáneamente: por una parte, a la proteína-G_i inhibidora de la actividad adenilato-ciclasa, y por otra parte a la hipotética proteína G_p- estimulante de la PLasa-C (131,132). Por lo tanto, la unión de la trombina a su receptor inducirá de forma paralela una reducción de los niveles de AMPc y el ataque de la PLasa-C sobre los polifosfoinosítidos.

En la Fig.6 aparece un esquema de las interacciones de los distintos receptores plaquetarios con las proteínas-G correspondientes.

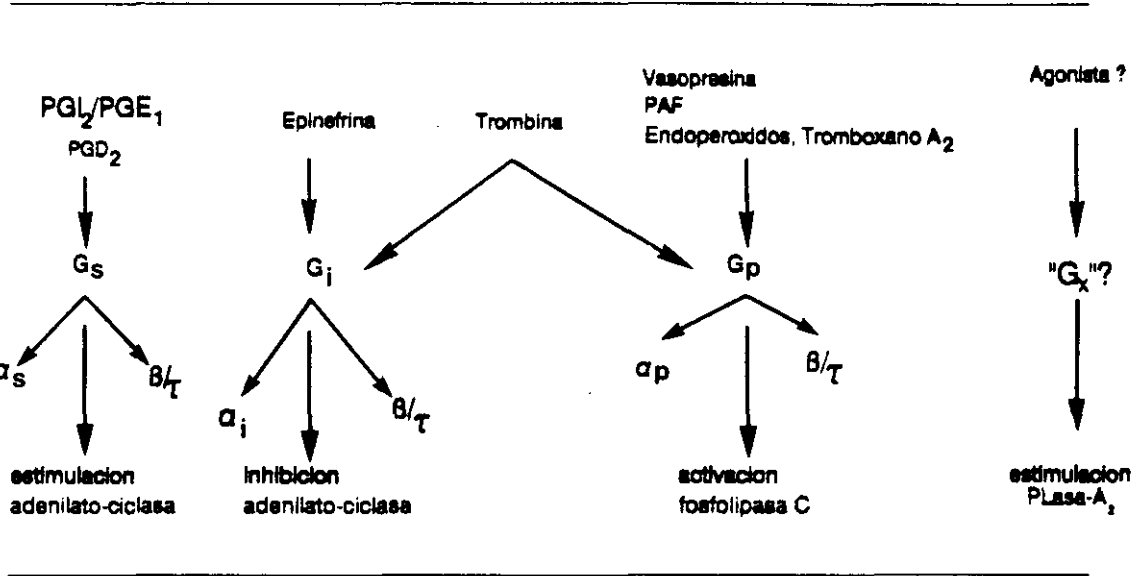


FIG. 6. INTERACCIONES DE DIVERSOS RECEPTORES PLAQUETARIOS CON PROTEINAS-G-REGULADORAS

4.1.1.2.2.- Existencia de G_p en plaquetas

Los autores que proponen la existencia de G_p en plaquetas, se basan principalmente en la capacidad del GTP y sus análogos-no-hidrolizables para estimular la degradación de los fosfoinosítidos en plaquetas permeabilizadas (134,136,137) y en el hecho de que los análogos del GDP (como el GDPβS) (138) y la toxina-pertussis (139,140) bloqueen la

hidrólisis de polifosfoinosítidos; además, se ha comprobado que el NaF (activador directo de las proteínas-G por inhibir la actividad GTP-asa), induce la activación de la PLasa-C en plaquetas (141).

Los resultados de los estudios sobre la sensibilidad de Gp-plaquetaria a toxina-pertussis (la cual ADP-ribosila e inactiva a Gi), son contradictorios; algunos autores (142,125) sostienen que la toxina-pertussis no tiene efecto inhibitorio sobre la actividad PLasa-C estimulada por trombina o GTP- γ S, mientras que en otros trabajos se describe que la proteína-Gp plaquetaria sí es sensible a concentraciones elevadas (19 μ g/ml) de toxina-pertussis (139,140).

La identidad real de la proteína-Gp en plaquetas no ha podido ser aclarada hasta el momento, a pesar de los numerosos intentos realizados para purificar Gp a partir de preparados de estas células. Brass y col. (139) han demostrado que el tratamiento de plaquetas permeabilizadas con toxina-pertussis ADP-ribosila una proteína de 41 kDa de peso molecular (" α 41"), que podría corresponder a α p; sin embargo, estos autores no descartan que esta " α 41" que resulta fosforilada sea en realidad α i (la subunidad- α de Gi). Otros grupos (140) han aislado en las mismas condiciones dos proteínas ADP-ribosiladas: una de 30 kDa (α 30) y otra de 41 kDa (α 41), sugiriendo que α 30 podría corresponder a α p. Lapetina y col (143), proponen que Gp podría estar relacionada con las proteínas-G de pesos moleculares entre 21-30 kDa que su grupo ha aislado recientemente en plaquetas.

Algunos autores aseguran que la proteína-Gp plaquetaria es distinta de Gi basándose en la incapacidad de la epinefrina (la cual estimula a Gi) para inducir la activación de la PLasa-C (25,144). Sin embargo, y a pesar de que la mayoría de los autores se inclinan por la hipótesis de que Gp es distinta de Gi, con los datos existentes hasta el momento no se puede descartar aún la posibilidad de que en realidad se trate de la misma proteína ejerciendo dos funciones diferentes.

4.1.1.2.3.- Regulación de Gp en plaquetas

Basándose en estudios realizados con GDP β S y toxina-pertussis en plaquetas permeabilizadas, Lapetina y col. (145), han sugerido la existencia de una proteína-G adicional en plaquetas que tendría efectos inhibitorios sobre Gp (asemejando así este sistema al sistema de la adenilato-ciclasa, en el que Gi inhibe a Gs).

Este grupo no descarta que la propia Gi pueda ser la responsable de la inhibición de Gp, habiendo propuesto que la disociación de la subunidad- α i como consecuencia de la interacción de la trombina con su receptor, y la posterior fosforilación de esta subunidad- α i por la PKC, podrían inducir el desacoplamiento del complejo Receptor/Gp/PLasa-C interrumpiendo así la hidrólisis de polifosfoinosítidos (146).

Sin embargo, las evidencias en favor de este modelo son todavía insuficientes, permaneciendo aún sin aclarar la posible existencia de una proteína-G inhibidora de Gp y su mecanismo regulador.

4.1.1.3.- Fosfolipasa-C

El punto crítico regulado por la activación del receptor parece ser el ataque fosfodiastérico del $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ por una fosfolipasa-C específica (EC.3.1.4.10.), conocida también con el nombre de fosfoinositidasa (147).

Se ha demostrado repetidamente la existencia de una PLasa-C específica para lípidos de inositol en las plaquetas (148). La activación de esta PLasa-C es completamente dependiente de la ocupación de receptores; solamente los agonistas que se unan a receptores específicos sobre la superficie plaquetaria inducirán la hidrólisis de fosfoinosítidos por la PLasa-C.

Aunque se ha podido detectar cierto grado de actividad fosfolipasa-C a nivel de las membranas, la localización de esta enzima en las plaquetas en reposo es predominantemente citosólica (149). Sin embargo, los receptores plaquetarios y los sustratos para esta enzima se sitúan en la membrana plasmática; esto implica que, en algún momento durante las primeras fases de la activación plaquetaria, la PLasa-C debe ser traslocada desde el citoplasma a la membrana plasmática para así poder interactuar con la supuesta proteína-Gp, o bien cabe la posibilidad de que alguna subunidad de Gp abandone la membrana para contactar con la PLasa-C en el citosol (150,151).

Los requerimientos de calcio de la Fosfoinositidasa parecen ser variables en los diferentes sistemas celulares; en plaquetas (152,153,154) y algunos otros tipos celulares (parótida (155), hepatocitos (156), fibroblastos (157), ganglio cervical superior (158)), la hidrólisis de polifosfoinosítidos es completamente independiente del calcio extracelular. Sin embargo, en otros tejidos (neutrófilos (159), páncreas (160), sinaptosomas y cortical cerebrales (161), células musculares lisas iridales (162)), la estimulación de la fosfoinositidasa es al menos parcialmente dependiente de calcio, y en la mayoría de los casos activable por ionóforos cálcicos. En cualquier caso, la presencia de GTP o de sus análogos no hidrolizables en el medio de incubación reduce significativamente la concentración de calcio requerida para la activación de la fosfoinositidasa (151), disminuyendo asimismo los niveles de calcio necesarios para la secreción de serotonina inducida por trombina en plaquetas permeabilizadas (136). Estas observaciones indican que las proteínas-G aumentan la sensibilidad al calcio de la fosfoinositidasa, aunque el mecanismo íntimo de este fenómeno no ha podido ser esclarecido hasta el momento. (Las acciones de las proteínas-G como moduladoras de la sensibilidad al calcio de la PLasa-C parecen ser independientes de sus funciones en la transducción de señales descritas en el apartado 4.1.1.2.).

Por otra parte, se ha comprobado en repetidas ocasiones que la concentración de calcio requerida para la activación de la hidrólisis de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ por la fosfoinositidasa en plaquetas, es igual o inferior a la concentración citosólica de calcio existente en las células en reposo ($0.1\mu\text{M}$) (154). En consecuencia, es evidente que la concentración citoplasmática de calcio no es un factor limitante para el ataque de la fosfoinositidasa sobre el $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ (163,153,154), aunque sí puede serlo para la degradación de $\text{PtdIns}(4)\text{P}$ y/o PtdIns (163,164).

Los ionóforos cálcicos (A23187, ionomicina), que provocan la activación plaquetaria como consecuencia del aumento de la concentración citosólica de calcio al movilizarlo a partir de los depósitos intracelulares, no inducen la hidrólisis de los fosfoinosítidos (165,166) (ver apartado 4.2.).

La PLasa-C plaquetaria muestra una relativa especificidad por los polifosfoinosítidos (150). En general los estudios sobre actividad PLasa-C revelan que esta enzima hidroliza aproximadamente en igual medida PtdIns, PtdIns(4)P y PtdIns(4,5)P₂ en presencia de concentraciones milimolares de calcio, pero sin embargo parece mostrar una mayor afinidad por PtdIns(4,5)P₂ cuando la concentración de calcio está en el rango micromolar (150,167).

Estudios *in-vitro* han demostrado que el contenido en ácidos grasos de un fosfoinosítido no es un factor determinante para su degradación por la PLasa-C (168); sin embargo, se ha comprobado que en plaquetas intactas estimuladas existe una clara preferencia de la PLasa-C por los fosfoinosítidos de las especies 1-acil-2-araquidonil. Esto puede ser debido a una compartimentalización especial de enzima y sustrato dentro de la célula (169,170).

La activación de la Fosfoinositidasa está implicada en todas las respuestas de activación plaquetaria: cambio de forma, secreción y agregación. Sin embargo, parece que la activación de la PLasa-C que va asociada al cambio de forma es distinta de la que se produce durante la secreción, habiéndose descrito una activación bifásica de esta enzima en las plaquetas estimuladas con trombina: tras la unión de la trombina a su receptor, se observa una ligera activación inicial de la PLasa-C durante el cambio de forma, seguida de una activación más intensa y sostenida durante el proceso de secreción (25).

4.1.2. Segundos mensajeros

4.1.2.1.- Segundos mensajeros transmisores de señales de activación

Al igual que en otros muchos tipos celulares, la unión de los agonistas a sus receptores específicos sobre la superficie plaquetaria desencadena el ataque fosfodiastérico del PtdIns(4,5)P₂, dando lugar a la formación de dos segundos mensajeros:

1. Inositol 1,4,5-Trisfosfato (Ins(1,4,5)P₃)
2. 1,2-Diacilglicerol (1,2-DAG)

* Como consecuencia del ataque de la PL-C sobre el PtdIns(4,5)P₂ también se forma Inositol (1:2-ciclo 4,5)-trisfosfato (Ins(1:2cyc,4,5)P₃), aunque en mucha menor proporción que el Ins(1,4,5)P₃ (el Ins(1:2cyc,4,5)P₃ representa menos del 5% de los inositoles-fosfato generados por la hidrólisis del PtdIns(4,5)P₂, mientras que el Ins(1,4,5)P₃ representa más del 95%)

POLIFOSFOINOSITIDOS PLAQUETARIOS

Los lípidos de inositol constituyen aproximadamente el 5-10 % del total de los fosfolípidos en la mayoría de las células animales incluidas las plaquetas. Al igual que otros fosfolípidos ácidos, los fosfoinosítidos se localizan predominantemente en la porción citoplásmica de las membranas plasmática e intracelulares (171). En las plaquetas, el fosfatidilinositol (PtdIns) está presente tanto en la membrana plasmática como en las intracelulares (DTS), mientras que los polifosfoinosítidos, fosfatidilinositol 4-fosfato (PtdIns(4)P) y fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PtdIns(4,5)P₂), se localizan casi exclusivamente en la membrana plasmática (172,173).

El fosfoinosítido mayoritario en plaquetas es el PtdIns, ya que el PtdIns(4)P y el PtdIns(4,5)P₂ constituyen menos del 10% del total de fosfoinosítidos en estas células. En las plaquetas en reposo existe una continua interconversión de fosfoinosítidos mediada por la acción de quinasas-asociadas a membrana y fosfatasas-citosólicas (174,175).

Algunos autores han descrito recientemente la existencia de un nuevo polifosfoinosítido (PtdIns(3,4)P₂) en plaquetas humanas estimuladas con trombina, indicando así la existencia de actividad fosfoinosítido-3-quinasa en estas células (176). Este nuevo polifosfoinosítido no parece servir de sustrato a la Fosfoinositidasa, habiéndose sugerido su posible implicación en los fenómenos de proliferación y transformación celular (176,177).

METABOLISMO DE POLIFOSFOINOSITIDOS

En la actualidad existe una extensa bibliografía acerca de la rápida hidrólisis que experimentan los polifosfoinosítidos como consecuencia de la activación de receptores en numerosos sistemas celulares; entre la gran variedad de estímulos capaces de inducir esta respuesta se incluyen neurotransmisores, factores de crecimiento, hormonas, proteasas e incluso la luz (amplias revisiones sobre el tema en referencias 178 y 179).

La primera evidencia sobre la activación del metabolismo de fosfoinosítidos en plaquetas estimuladas, se obtuvo al demostrar que tras activar plaquetas marcadas con ³²P aumentaba la incorporación de ³²P en ácido fosfatídico, PtdIns, PtdIns(4)P, y PtdIns(4,5)P₂ (180,181). Más tarde, se pudo comprobar que la trombina inducía un aumento transitorio de los niveles de diacilglicerol acompañado de un descenso del PtdIns (182,183), y se describió una PLasa-C plaquetaria específica para fosfoinosítidos (182,184). Estos hallazgos, junto con la demostración de la existencia de las enzimas necesarias para la síntesis de PtdIns a partir de ácido fosfatídico en plaquetas (185,186), sirvieron de base para establecer la existencia de un metabolismo de fosfoinosítidos activable por ciertos agonistas en estas células.

El metabolismo de los fosfoinosítidos aparece representado esquemáticamente en la Fig.7.

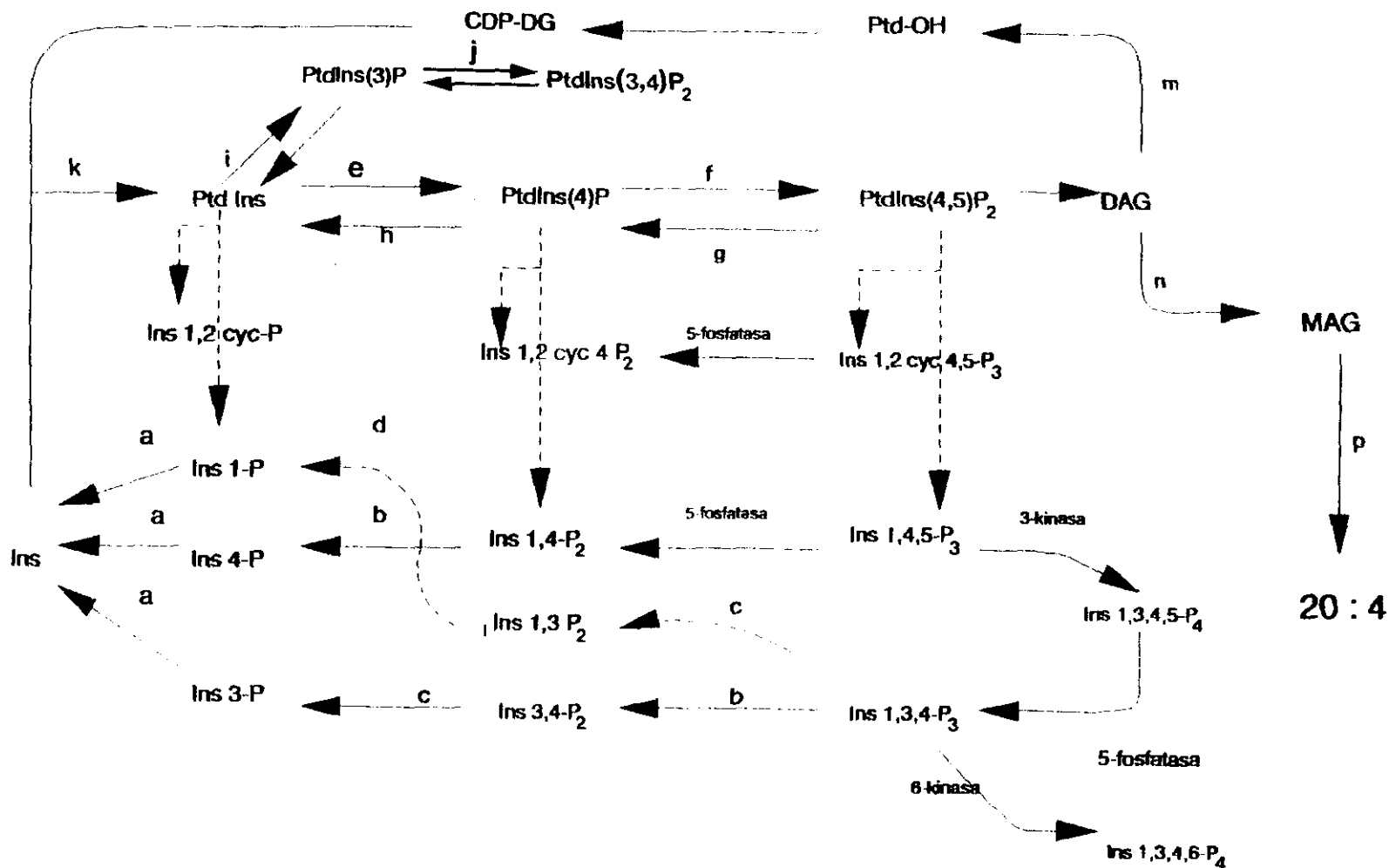


FIG. 7. METABOLISMO DE INOSITOLES FOSFATO EN PLAQUETAS ACTIVADAS.

(a: Inositol monofosfato fosfatasa, b: inositol polifosfato 1-fosfatasa, c: Inositol polifosfato 4-fosfatasa, d: Inositol polifosfato 3-fosfatasa, e: PtdIns-4-kinasa, f: PtdIns(4)P-5-kinasa, g: PtdIns(4,5)P₂ -fosfomonoesterasa, h: PtdIns(4)P-fosfomonoesterasa, i: PtdIns-3-kinasa, j: PtdIns(3)P-4-Kinasa, k: PtdIns-sintetasa (inositol-fosfatidil-transferasa), m: DAG-kinasa, n: DAG-lipasa, p: MAG-lipasa)

Numerosos estudios han demostrado que como consecuencia de la estimulación de las plaquetas de diversas especies con determinados agonistas (trombina, colágeno, serotonina, vasopresina, PAF, ADP, ácido araquidónico, y análogos de endoperóxidos cíclicos y TxA_2) se produce un rápido descenso del $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ (7,187); este descenso empieza a ser detectable al cabo de unos 5 sg tras la estimulación con trombina, pero es transitorio, de tal forma que al cabo de 10 sg post-estimulación los niveles de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ retornan a sus valores basales o incluso llegan a superarlos (188). Este descenso de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ es atribuible en su mayor parte al ataque de la PLasa-C específica para fosfoinosítidos (fosfoinositidasa); sin embargo, estudios recientes han demostrado que la adición de AMPc a plaquetas estimuladas bloquea la formación de ácido fosfatídico e inositoles-fosfato pero no inhibe la degradación de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$, lo cual parece indicar que el $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ puede ser también degradado por la acción de fosfomonoesterasas citosólicas además de por la Fosfoinositidasa plaquetaria (75,152).

Por otra parte, los niveles de $\text{PtdIns}(4)\text{P}$ no descienden tras la estimulación plaquetaria, sino que por el contrario parecen aumentar tras un lapso de 30 sg después de la adición del agonista (188,189), probablemente para suplir al $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ que está siendo degradado.

PRODUCTOS DERIVADOS DE LA HIDROLISIS DE POLIFOSFOINOSITIDOS

El ataque fosfodiastérico de la PLasa-C sobre el $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ da lugar a la formación de Inositol 1,4,5-Trisfosfato ($\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$) y 1,2-Diacilglicerol (DAG) (190,191,178).

4.1.2.1.1. Formación y metabolismo de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$

Una vez formado a partir del $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$, el $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ puede ser atacado por una 5'-fosfatasa específica que lo transforma en $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$ (199), o bien por una 3-quinasa específica que lo convierte en $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ (200).

La 5'-fosfatasa específica ($\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -5'-fosfatasa), posee mayor afinidad de sustrato por el $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ que por los restantes inositoles-fosfato, aunque se ha demostrado que también es capaz de defosforilar el $\text{Ins}(1:2\text{cyc},4,5)\text{P}_3$ y el $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ en plaquetas (200,201). Al contrario de lo que sucede en otros tipos celulares, la 5'-fosfatasa plaquetaria es una enzima predominantemente citosólica (199), aunque trabajos recientes han detectado también esta actividad enzimática en la fracción particulada de las plaquetas humanas (202). Se ha postulado que esta enzima podría estar regulada por la proteína-quinasa-C (ver apartado 4.1.3.2)

Finalmente, la acción secuencial de dos fosfatasas citosólicas sobre los inositoles-bisfosfato y los inositoles-monofosfato respectivamente, dará lugar a la formación de mio-inositol libre (179) que será utilizado para la síntesis de PtdIns .

La otra posible ruta metabólica del $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, consiste en su fosforilación por una 3-quinasa dependiente del sistema calcio-calmodulina, para formar $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ (203). Se

ha demostrado la existencia de esta ruta metabólica en plaquetas estimuladas por trombina, habiéndose detectado asimismo la existencia de una 5-quinasa que convierte el $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ en $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ (197).

Formación de otros Inositoles-Fosfato

Estudios realizados en plaquetas marcadas han permitido detectar incrementos de radiactividad en los siguientes inositoles-fosfato como consecuencia de la estimulación con agonistas específicos: inositol-1-monofosfato, inositol-4-monofosfato, inositol 1,4-bisfosfato, inositol 1,4,5-trisfosfato (192,193,194). En plaquetas estimuladas con trombina también se han detectado aumentos en inositol 1:2-ciclo-monofosfato (195) e inositol 1:2 ciclo-4,5-trisfosfato (196). Trabajos recientes han demostrado también la formación de inositol 1,3,4-trisfosfato e inositol 1,3,4,5-tetraquisfosfato en plaquetas activadas por trombina (197).

La formación de los distintos Inositoles-Fosfato en plaquetas humanas estimuladas es extraordinariamente rápida; a los 1-2 sg tras la adición de trombina, ya se pueden detectar incrementos de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, seguidos inmediatamente por aumentos de los niveles de $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$. El $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ empieza a aumentar a los 4 sg, los inositoles-bisfosfatos a los 5 sg, y los inositoles-monofosfatos al cabo de 10-15 sg post-estimulación (193,194,197).

Asimismo, se ha demostrado la formación de inositol 1:2 ciclo-4,5-trisfosfato ($\text{Ins}(1:2\text{cyc},4,5)\text{P}_3$) en plaquetas activadas por trombina (196); la producción de $\text{Ins}(1:2\text{cyc},4,5)\text{P}_3$ es mucho más lenta que la de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, pero sin embargo sus niveles se mantienen elevados durante períodos más largos de tiempo. Por este motivo, se ha sugerido que el $\text{Ins}(1:2\text{cyc},4,5)\text{P}_3$ podría actuar como segundo mensajero en fases tardías de la activación celular, aunque es poco probable que desempeñe esta función a tiempos cortos (198).

Efecto del $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ y otros inositoles-fosfato sobre la funcionalidad plaquetaria

Ya en la década de los 70, Michell propuso que algún segundo mensajero derivado de la hidrólisis de polifosfoinosítidos podía estar implicado en la movilización intracelular de calcio (212), hipótesis que fue confirmada poco después por el grupo de Fain y Berridge (213). Posteriormente se ha podido comprobar en una gran variedad de sistemas celulares que la molécula que acopla la hidrólisis de polifosfoinosítidos con la liberación de calcio a partir de los depósitos intracelulares, es el $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ (214).

Los resultados de numerosos trabajos realizados con membranas aisladas y plaquetas permeabilizadas, demuestran que el $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ también es capaz de movilizar calcio en estas células (215,216,217,218,219). Las concentraciones efectivas de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ oscilan entre 1-10 μM (similares a las descritas en otros tipos celulares), niveles que son perfectamente compatibles con el grado de hidrólisis de polifosfoinosítidos y la cantidad de inositoles-fosfato producidas en plaquetas estimuladas (220).

a) Capacidad de los distintos inositoles-fosfato para movilizar calcio

La mayoría de los autores coinciden en que la presencia de dos grupos fosfato en posiciones -4 y -5 es esencial para que los inositoles-fosfato tengan capacidad para liberar calcio a partir de los depósitos intracelulares, mientras que el grupo fosfato de la posición -1 serviría muy probablemente para incrementar la afinidad de la molécula por su receptor (221,222) (no obstante, se ha comprobado que también el $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ es capaz de movilizar calcio, si bien con una potencia mucho menor (1/10) que el $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ (223)).

También el $\text{Ins}(1:2\text{cyc},4,5)\text{P}_3$ tiene capacidad para movilizar calcio en plaquetas permeabilizadas y en un grado similar al $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ (224), si bien parece que la formación de $\text{Ins}(1:2\text{cyc},4,5)\text{P}_3$ en plaquetas activadas es demasiado escasa y lenta como para tener alguna significación fisiológica (220). Por el contrario, el $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ no moviliza calcio a partir de los depósitos intracelulares plaquetarios, aunque se sospecha que puede estar implicado en la entrada de calcio extracelular durante la activación, probablemente por inducir la apertura de canales de calcio en la membrana plasmática (225,226).

b) Movilización de calcio en respuesta al $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$

El mecanismo por el cual el $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ induce la liberación del calcio secuestrado en el retículo endoplásmico (Sistema Tubular Denso en plaquetas) no está del todo claro, aunque la mayoría de los autores están de acuerdo en que el $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ actúa vía-receptor. Varios hallazgos recientes parecen confirmar esta teoría: en primer lugar, se ha comprobado la existencia de lugares de unión específicos para el $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ en la membrana del retículo endoplásmico de varios tipos celulares (227,228); por otra parte, se ha podido sintetizar un anticuerpo monoclonal que bloquea la liberación de calcio inducida por el $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ en vesículas de membrana plaquetarias (140); y finalmente, se ha purificado y caracterizado a partir de cerebelo de rata un receptor altamente específico para $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ (260 kDa) (229), habiéndose confirmado posteriormente la localización de este receptor a nivel del RE en células de Purkinje (230).

Aunque todavía se desconoce el mecanismo exacto de liberación de calcio activado por el $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, se piensa que la unión de este inositol-fosfato a sus receptores puede inducir de algún modo la apertura de canales de calcio (231,215,232,233). Recientemente se han podido detectar canales de calcio sensibles al $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ en el retículo sarcoplásmico de las células musculares lisas aórticas (234), y por otra parte, experimentos realizados con el receptor purificado sugieren que el lugar de unión para el $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ y el canal de calcio que éste último regula pueden estar localizados en la misma proteína (235).

También existen evidencias indicativas de que el $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ induce la liberación del calcio intracelular simplemente por potenciar el eflujo pasivo de este catión desde el RE al citosol (236), sin afectar al influjo ATP-dependiente (237,238). Algunos autores han comprobado que el K^+ actúa como contraión en la movilización de calcio inducida por el $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ (232,233).

Sin embargo, parece que solamente una parte del calcio contenido en el retículo endoplásmico es sensible al $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$; los recientes trabajos de Thevenod y col. (239) demuestran que el $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ libera únicamente un 30-50% del calcio secuestrado en el depósito no-mitocondrial, pudiendo ser liberado el calcio restante mediante la adición de ionóforos cálcicos (239). Se ha sugerido que el almacén de calcio sensible al $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ puede radicar en una región del RE localizada inmediatamente por debajo de la membrana plasmática (240,241), aunque otros autores han llegado incluso a proponer que los depósitos de calcio sensibles al $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ pueden estar constituidos por compartimentos de membrana distintos del RE (239,242) que podrían localizarse en la propia membrana plasmática (243) o en unas organelas citoplasmáticas denominadas calciosomas (244).

Es importante mencionar que algunos autores han sugerido que el $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ no es el único responsable de la liberación de calcio a partir de los depósitos internos en plaquetas estimuladas, basándose fundamentalmente en la capacidad que posee el ADP para incrementar la concentración citosólica de calcio a pesar de que este agonista no induce un grado significativo de hidrólisis de polifosfoinosítidos ni la formación de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ (245,246,247).

Además de su bien conocida función como movilizador del calcio intracelular, el $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ plaquetario parece estar también implicado en la entrada de calcio extracelular intercambiándolo probablemente por Na^+ (226,140).

Numerosos estudios con plaquetas permeabilizadas han demostrado que la adición de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, además de inducir la movilización de calcio, produce también activación de la fosfoinositidasa, fosforilación de proteínas, formación de TxA_2 , secreción y agregación (248,249,216). Todas estas respuestas (exceptuando la movilización de calcio) pueden ser bloqueadas mediante la adición de inhibidores de la ciclooxigenasa y/o antagonistas de los receptores para TxA_2 y endoperoxidos cíclicos, lo cual indica que las respuestas plaquetarias al $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ citadas anteriormente están mediadas por los metabolitos oxigenados activos del ácido araquidónico. Estos datos indican asimismo que la movilización de calcio inducida por el $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ no es suficiente por sí misma para desencadenar la secreción y agregación plaquetarias.

4.1.2.1.2. Formación y metabolismo de 1,2- Diacilglicerol (1,2-DAG)

El otro compuesto generado por la hidrólisis del $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$, es el 1,2-Diacilglicerol (1,2-DAG) (204).

Las plaquetas humanas generan cantidades significativas de 1,2-DAG a los pocos segundos de ser estimuladas con trombina. La formación de 1,2-DAG es transitoria; llega a alcanzar niveles 30 veces superiores a los basales al cabo de 15 sg tras la estimulación, para después ir disminuyendo hasta volver al nivel basal (182). El 1,2-DAG generado durante la activación plaquetaria contiene predominantemente ác. esteárico y ác. araquidónico esterificados en posición *sn*-1 y -2 respectivamente (205,173).

Algunos autores han descrito un descenso de PtdIns concomitante al aumento de los niveles de 1,2-DAG tras la estimulación con trombina, que parece deberse al ataque del PtdIns por una PLasa-C que generaría inositol 1-monofosfato y 1,2-DAG (182,172). Esta PLasa-C podría ser activada directamente por la interacción de la trombina con su receptor, o indirectamente por el calcio movilizado durante la estimulación plaquetaria, siendo capaz también de hidrolizar el PtdIns(4)P (206). Esta ruta constituiría una vía importante de formación de 1,2-DAG, pudiendo ser la principal responsable de la generación de 1,2-DAG en plaquetas estimuladas (es muy improbable que el 1,2-DAG formado durante la activación plaquetaria provenga en su totalidad del PtdIns(4,5)P₂, ya que los niveles de 1,2-DAG alcanzados son considerablemente superiores a los de Ins(1,4,5)P₃) (182).

Una vez formado, el 1,2-DAG es fosforilado rápidamente por una 1,2-DAG-Quinasa que lo convierte en ácido fosfatídico (Ptd-OH) (207). Los valores máximos de Ptd-OH en plaquetas estimuladas por trombina se alcanzan siempre después de que se haya producido el máximo de formación de 1,2-DAG (208), lo cual indica una acción secuencial de la PLasa-C y la 1,2-DAG-Quinasa (182).

La formación de Ptd-OH también es transitoria; el Ptd-OH será transformado en citidin-diglicérido para dar lugar finalmente a la resíntesis de PtdIns por acción de la inositol-fosfatidil-transferasa (185,186).

Efecto del 1,2-Diacilglicerol sobre la funcionalidad plaquetaria

La función principal del 1,2-DAG en las plaquetas, al igual que en otros muchos tipos celulares, consiste en actuar como segundo mensajero activador de la Proteína-Quinasa-C (PKC) en presencia de calcio y fosfatidilserina (204). Las consecuencias de la activación de la PKC en plaquetas se describen en el apartado 4.1.3.2.).

Otra importante función del 1,2-DAG en las plaquetas, consiste posiblemente en servir de fuente para la liberación de ácido araquidónico, mediante la acción secuencial de una diglicérido-lipasa y una monoglicérido-lipasa (ver apartado 5.2.1.).

Por otra parte, se ha propuesto que el 1,2-DAG puede mediar la activación de algunas fosfolipasas intracelulares. La estimulación de estas actividades enzimáticas por el DAG podría ser directa o bien indirecta al provocar el DAG cambios en la fluidez de la membrana que harían el sustrato más asequible a la enzima (250,251).

Efecto del ácido fosfatídico sobre la funcionalidad plaquetaria

Además de servir de fuente para la resíntesis de PtdIns, se ha sugerido que el Ptd-OH podría ejercer algún efecto sobre los flujos de calcio que se establecen en plaquetas activadas. Algunos estudios han demostrado que el Ptd-OH es capaz de aumentar la permeabilidad de las membranas al calcio, induciendo la traslocación de este catión a través de ellas (252). Otros estudios han demostrado que la adición de Ptd-OH a cultivos de células

de neuroblastoma aumenta considerablemente la captación de calcio extracelular por estas células (253), por lo que se ha propuesto que el Ptd-OH puede actuar como ionóforo cálcico o bien inducir la apertura de canales de calcio en las membranas celulares, si bien otros autores están en desacuerdo (255). Asimismo se ha comprobado que la movilización de calcio a partir del DTS producida en plaquetas permeabilizadas tras la adición de OAG (Oloacetilglicerol) está mediada por la conversión de este diglicérido en Ptd-OH (254).

Por otra parte, se ha propuesto que el Ptd-OH puede actuar como fusógeno en algunos sistemas celulares (256,257), por lo que podría jugar algún papel en la reacción de secreción plaquetaria.

Sin embargo, y a pesar de todo lo expuesto, se ha comprobado que la adición de Ptd-OH exógeno a una suspensión de plaquetas carece de efecto alguno (258), lo cual puede deberse a que en estas condiciones este fosfolípido no sea capaz de alcanzar sus lugares de acción específicos.

PARTICIPACION DEL METABOLISMO DE POLIFOSFOINOSITIDOS EN LA ACTIVACION PLAQUETARIA

La hidrólisis de fosfoinosítidos está implicada muy probablemente en todas las respuestas de activación plaquetaria a excepción de la agregación primaria reversible.

* El cambio de forma plaquetario parece ir siempre asociado a la hidrólisis de fosfoinosítidos; todos los agonistas que producen activación de la PLasa-C inducen el clásico cambio de forma, mientras que por el contrario, la epinefrina (que no estimula la hidrólisis de fosfoinosítidos) induce la agregación plaquetaria sin que previamente se produzca cambio de forma (25).

* La secreción plaquetaria está estrechamente relacionada con la hidrólisis de fosfoinosítidos mediada por receptor.

La hidrólisis de fosfoinosítidos que tiene lugar durante la secreción es cuantitativamente más significativa que la que se produce durante el cambio de forma; en general, la intensidad y duración de la secreción plaquetaria son proporcionales al grado de hidrólisis de fosfoinosítidos producido. Los agonistas fuertes (como la trombina), que inducen los niveles máximos de secreción de serotonina, son también los que inducen el mayor grado de activación de PLasa-C (209).

Sin embargo, existen algunos trabajos que niegan la participación de la hidrólisis de fosfoinosítidos en la secreción plaquetaria; en plaquetas permeabilizadas con saponina y en presencia de concentraciones altas de calcio, la trombina es capaz de inducir secreción sin que se produzca hidrólisis de fosfoinosítidos ni fosforilación de proteínas (210). Por otra parte, el tratamiento de las plaquetas con ionóforo A23187 antes de su estimulación con trombina, induce un estado refractario en cuanto a formación de inositoles-fosfato pero no afecta a la

secreción (211). Otros estudios han demostrado que la incubación de las plaquetas con GDPβS inhibe la producción de 1,2-DAG pero no la secreción estimulada por trombina (139).

Todos estos resultados apuntan a la existencia de vías alternativas para la secreción plaquetaria inducida por trombina, que parecen ser totalmente independientes de la hidrólisis de fosfoinosítidos.

4.1.2.2.- Segundos mensajeros transmisores de señales de inhibición

4.1.2.2.1.- AMPc

La unión de determinados agentes (como la prostaciclina o las prostaglandinas PGE₁ y PGD₂) a sus receptores de membrana específicos, ocasiona un incremento de los niveles intraplaquetarios de AMPc (259,260). Si bien la reducción de los niveles basales de AMPc no induce por sí misma la activación plaquetaria, se ha comprobado repetidamente que los aumentos del AMPc inhiben la agregación y secreción en estas células (261).

Los efectos inhibitorios del AMPc sobre la activación plaquetaria parecen estar mediados por la fosforilación AMPc-dependiente de una serie de proteínas o enzimas-diana, si bien hasta el momento solo se han podido caracterizar algunas de ellas. Varios estudios han demostrado que la estimulación de la adenilato-ciclasa en plaquetas intactas conduce a la activación de proteína-quinasa dependientes de AMPc (Proteína-quinasa-A) que fosforilarán proteínas con pesos moleculares de 22, 24, 50, y > 400 kDa (262,263,264).

Si bien existen todavía grandes discrepancias en cuanto a cuáles son las fases de la activación plaquetaria que resultan inhibidas por el AMPc, la mayoría de los autores están de acuerdo en que este segundo mensajero actúa a los siguientes niveles:

a) Inhibición de la exposición de receptores para el fibrinógeno; los aumentos de los niveles de AMPc bloquean la exposición del complejo GpIIb/IIIa sobre la superficie plaquetaria (265,266).

b) Inhibición del metabolismo de fosfoinosítidos: el AMPc inhibe la hidrólisis de los fosfoinosítidos por la fosfolipasa-C, si bien no se conoce exactamente a qué nivel se produce esta inhibición; no se ha podido demostrar ningún efecto directo ni indirecto del AMPc sobre la actividad enzimática (207,267), pero sí existen evidencias que indican una posible inhibición de la fosfatidilinositol-quinasa interfiriendo así el AMPc la resíntesis de polifosfoinosítidos (268).

c) Inhibición de la fosforilación protéica y del ajuste del citoesqueleto: los incrementos de los niveles intraplaquetarios de AMPc inhiben la fosforilación de la cadena ligera de miosina (MLC, 20kDa) y la posterior asociación de la miosina con el citoesqueleto (269,270,271).

d) *Inhibición de la movilización de calcio*: el AMPc bloquea el aumento de la concentración citosólica de calcio inducido por los agonistas plaquetarios que actúan vía-receptor (272,273). Así, el AMPc induce el secuestro del calcio que había sido previamente liberado al citoplasma por efecto del $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, ya que estimula el transporte de calcio ATP-dependiente al interior del sistema tubular denso plaquetario (274,275,276). Esta acción del AMPc está relacionada de manera todavía poco conocida con la fosforilación por la proteína-quinasa-A de una proteína de 22 kDa (denominada "trombolambán" por su semejanza funcional y estructural con el fosfolambán de las células musculares) (264,277). Se ha sugerido que el trombolambán en su forma no-fosforilada estaría inhibiendo la ATP-asa que transporta calcio al interior del sistema tubular denso; esta inhibición desaparecería al ser fosforilado el trombolambán por la proteína-quinasa-dependiente del AMPc, almacenándose así de nuevo en las organelas intracelulares el calcio que había sido previamente liberado al citosol (277).

e) *Inhibición de la unión de trombina a su receptor*: estudios recientes indican que el AMPc podría estar inhibiendo la activación plaquetaria por actuar directamente sobre los receptores de la membrana plasmática, impidiendo la unión de la trombina y otros agonistas a la superficie plaquetaria. Se ha demostrado que una de las proteínas fosforiladas por acción del AMPc en plaquetas intactas es la glicoproteína $\text{Ib}\beta$ (24 kDa), que sirve de receptor para trombina y vWF (273). La fosforilación de esta proteína podría impedir la normal interacción de estos agonistas con las plaquetas. Por otra parte, se ha demostrado que los aumentos del AMPc inducidos por la PGE_1 en plaquetas van asociados a una reducción de la exposición de receptores para trombina sobre la membrana plasmática (278).

4.1.3. Señales intracelulares

4.1.3.1.- Calcio / Calmodulina

El calcio juega un papel fundamental en diversos aspectos de la funcionalidad plaquetaria. Por una parte, el calcio unido a membrana es esencial para la expresión de los receptores del fibrinógeno y por tanto para la agregación, y por otra parte, los cambios de la concentración citosólica de calcio participan en los fenómenos de cambio de forma y secreción.

El aumento de los niveles citosólicos de calcio constituye una de las principales señales de activación en plaquetas, por lo que la regulación de los niveles intracelulares de calcio adquiere una gran importancia en estas células. La homeostasis de calcio en plaquetas no-estimuladas se mantiene mediante tres mecanismos básicos: limitando la entrada de calcio extracelular, favoreciendo activamente la salida de calcio, y secuestrando el calcio intracelular en algún depósito interno que casi con toda seguridad está constituido por el sistema-tubular-denso (279).

4.1.3.1.1. Regulación de los niveles intraplaquetarios de calcio

La concentración citosólica de calcio en las células en reposo es baja (100 nM) (280); en las plaquetas activadas, los niveles de calcio citosólico aumentan considerablemente, llegando a alcanzarse concentraciones 10 veces superiores a las basales. Este incremento de la concentración de calcio citoplasmático durante la activación se debe a la puesta en marcha de dos mecanismos principales: la liberación de calcio a partir de los depósitos intracelulares y la entrada de calcio extracelular.

a) *Entrada de calcio extracelular:*

La entrada de calcio extracelular durante la activación plaquetaria hace posible que los aumentos de la concentración citosólica de este catión sean más rápidos, marcados y sostenidos. La entrada de calcio al interior de las plaquetas se produce mayoritariamente mediante la apertura de canales iónicos en la membrana plasmática. Los canales de calcio plaquetarios no parecen ser voltaje-dependientes (281,282), habiéndose demostrado que su apertura está mediada muy probablemente por la ocupación de receptores (283) ya sea directamente (Receptor para ADP (284)) o a través de algún segundo mensajero (Receptores para trombina, vasopresina, PAF y análogos del TxA_2 (285)).

Por otra parte, estudios recientes han evidenciado la posible existencia en plaquetas de un mecanismo de entrada de calcio regulado por el grado de depleción de los almacenes intracelulares ; una vez deplecionados, los depósitos intraplaquetarios de calcio se rellenan de nuevo en presencia de calcio extracelular sin que se produzcan incrementos de la concentración citosólica de este catión, lo cual indica la existencia de algún tipo de conexión entre la membrana plasmática y los almacenes intracelulares (279,286).

b) *Liberación del calcio almacenado en los depósitos intracelulares*

La observación de que ciertas respuestas plaquetarias calcio-dependientes se podían inducir en ausencia de calcio extracelular, condujo a pensar que ciertos agonistas eran capaces de provocar la liberación del calcio contenido en los depósitos intracelulares, hecho que ha sido confirmado posteriormente por numerosos autores (279). Entre estos agonistas se incluyen la trombina, el TxA_2 , la serotonina, la vasopresina, el PAF y el ADP.

Los mecanismos reguladores de la movilización intracelular de calcio en plaquetas son realmente complejos, estando implicados diversos segundos mensajeros y sistemas enzimáticos entre los que se incluyen el $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, el AMPc, la PKC y muy posiblemente el GMPc y el pH-citosólico (ver apartados correspondientes).

La fuente mayoritaria para la liberación de calcio en plaquetas activadas parece ser el DTS, el cual constituye el almacén intraplaquetario de calcio sensible al $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$; como consecuencia de la unión del $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ a su receptor, el DTS libera calcio de una forma rápida ($< 5\text{sg}$) y dosis-dependiente (287,215,217,231).

Como consecuencia del aumento de los niveles citoplasmáticos de calcio se produce la activación de determinadas proteínas plaquetarias calcio-dependientes, estimulándose así diversos sistemas intracelulares implicados en las respuestas de activación. Entre estos sistemas se encuentran: la Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPasa (288), la fosfolipasa- A_2 (289), la quinasa de las cadenas ligeras de la miosina (MLCK) (290), proteasas neutras calcio-dependientes (calpaínas) (291,292), y ciertas proteínas del citoesqueleto.

La dependencia de calcio de las distintas respuestas de activación plaquetaria es variable; el cambio de forma y la secreción son independientes del calcio extracelular, mientras que la agregación sí requiere la presencia de este catión en el medio para poder producirse. A pesar de su total independencia del calcio extracelular, el cambio de forma y la secreción se acompañan invariablemente de incrementos de la concentración citosólica de calcio: en el caso del cambio de forma la proteína-diana parece ser la MLCK-calmodulina-dependiente, y es interesante reseñar que agentes que no inducen el cambio de forma plaquetario (como la epinefrina y los ésteres de forbol) no provocan aumentos del calcio intracelular (293,273). En cuanto a la secreción, parece que la liberación del calcio contenido en los depósitos intracelulares precede a la reacción de exocitosis (294). Experimentos con plaquetas permeabilizadas demuestran que se puede inducir la secreción de los gránulos densos y lisosomas simplemente incrementando la concentración de calcio del medio extracelular (231,295). Otros autores han demostrado que la trombina, los análogos del GTP, los ésteres de forbol y el diacilglicerol, son capaces de aumentar la sensibilidad del proceso de secreción al calcio (296,297,298). Estos datos sugieren que el incremento de la concentración citosólica de calcio y la PKC activada por el 1,2-DAG actúan de manera sinérgica para mediar la secreción plaquetaria.

Sin embargo, la demostración de que la trombina y el colágeno por un lado y los ésteres de forbol y el diacilglicerol por otro, son capaces de inducir la secreción sin aumentar la concentración citosólica de calcio, parece indicar que el calcio no juega un papel esencial en este proceso, lo cual ha llevado a pensar que el principal mecanismo mediador de la secreción en plaquetas está constituido por la activación de la PKC (293,280).

4.1.3.2.- Proteína-Kinasa-C (PKC)

En 1979, Nishizuka y col. demostraron la existencia de una proteína-quinasa que requería la presencia de calcio, un fosfolípido (fundamentalmente fosfatidilserina) y diglicérido para ejercer su actividad máxima, y la denominaron proteína-quinasa-C (PKC) (299,300). Esta proteína-quinasa-C ha sido posteriormente encontrada en prácticamente todos los tejidos de mamíferos incluidas las plaquetas (300).

La formación de 1,2-DAG durante la activación plaquetaria, aunque transitoria, se acompaña siempre de la estimulación de la PKC (301,300). La activación de la PKC es inducida específicamente por los sn-1,2-diacilgliceroles (302). El papel primordial del 1,2-DAG en la activación de la PKC parece consistir en incrementar la afinidad de esta proteína-

quinasa por el calcio, permitiendo así que la PKC pueda ser estimulada en presencia de concentraciones fisiológicas de calcio (rango micromolar) (303). La adición de diacilglicerol sintéticos (como el 1-oleil-2-acetilglicerol, OAG) o de ésteres de forbol a plaquetas intactas, induce la activación de la PKC mimetizando los efectos del 1,2-DAG endógeno (304,305).

En las plaquetas en reposo la PKC está presente en forma inactiva en el citosol; durante la activación celular se produce la traslocación de la PKC desde el citosol a la membrana plasmática (300,306), muy probablemente por la acción sinérgica del calcio y el 1,2-DAG (304,307). Una vez activada, la PKC fosforilará proteínas específicas en residuos serina y treonina, estando la mayoría de estas proteínas implicadas en fenómenos de secreción y proliferación (204,308).

El sustrato principal de la PKC plaquetaria es una proteína citosólica que, dependiendo de las condiciones de electroforesis, muestra un peso molecular de 40- o 47kDa (309,310). Hasta el momento se desconocen la identidad y función de esta proteína de 47kDa; los trabajos más recientes indican que puede tratarse de lipocortina (311), o bien de la 5'-fosfatasa específica que degrada el $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ (312), siendo más probable esta última posibilidad (313,314,199).

Efectos de la PKC sobre la activación plaquetaria

La PKC ejerce efectos aparentemente contradictorios sobre la activación plaquetaria: por un lado parece estimular determinados parámetros de la activación, mientras que al mismo tiempo parece actuar como inhibidor a varios niveles.

a) Efectos estimulantes:

* La PKC y el calcio parecen actuar de manera sinérgica en la inducción de la secreción y agregación plaquetarias. La adición conjunta de diacilglicerol y concentraciones subcríticas de ionóforo cálcico A23187 a una suspensión de plaquetas, induce rápidamente la secreción y la agregación (305,315), potenciando también la liberación de ácido araquidónico y la posterior formación de Tromboxano- A_2 (316,317).

Estudios recientes utilizando inhibidores de la PKC que bloquean la fosforilación de la proteína de 47 kDa en plaquetas intactas, han demostrado que estos agentes inhiben la secreción y reducen la agregación secundaria, pero sin afectar al cambio de forma ni a la agregación primaria (318,319,320). Estos resultados sugieren claramente la implicación de la PKC como señal positiva en la secreción y agregación plaquetarias. También se ha comprobado que los ésteres de forbol son capaces de inducir la agregación en ausencia de secreción, y que además potencian la unión del fibrinógeno a las plaquetas (321,322), lo cual parece confirmar la supuesta participación de la PKC en la agregación.

* Otra función de la PKC en plaquetas activadas parece radicar en la estimulación del intercambiador Na^+/H^+ , induciendo así una alcalinización del citoplasma necesaria para la posterior activación de diversas enzimas. Siffert y col (323) han demostrado que la activación de la PKC mediante ésteres de forbol induce una alcalinización del citoplasma equiparable a la producida por 0.5 U/ml de trombina (aumento de 0.1-0.15 unidades de pH), sugiriendo que la alcalinización del citosol inducida por la trombina está mediada por la PKC.

b) Efectos inhibitorios:

Se ha comprobado que la PKC desensibiliza algunas respuestas de activación en plaquetas. Varios grupos han descrito que la preincubación de las plaquetas con OAG o ésteres de forbol inhibe la hidrólisis de polifosfoinosítidos y la generación de segundos mensajeros inducidas por los agonistas fisiológicos, bloqueando al mismo tiempo la movilización de calcio, formación de Tromboxano, cambio de forma, secreción y agregación (324,325,326,327,328,329).

Los efectos inhibitorios de la PKC sobre la activación plaquetaria pueden deberse a una aceleración del metabolismo del $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ (si el sustrato de la PKC plaquetaria es la $5'\text{-Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -fosfatasa), o bien a la inhibición de la hidrólisis de polifosfoinosítidos (304,321). Basándose en los trabajos de Jakobs y col. sobre el mecanismo de inhibición de la adenilato-ciclase por la PKC (330) y en los suyos propios, Smith y col. (331) han propuesto que la PKC podría fosforilar la subunidad- α de la proteína-Gp, bloqueando así la transducción de la señal de activación emitida por el receptor. Varios trabajos parecen apoyar esta hipótesis (332,333), aunque todavía no está plenamente confirmada.

Por otra parte, Lapetina y col. (146) han comprobado que la PKC es capaz de fosforilar la subunidad- α de la proteína-Gi, proponiendo que esta fosforilación podría bloquear la hidrólisis de polifosfoinosítidos (ver apartado 4.1.1.2.).

Todos estos datos en conjunto ponen de manifiesto que la participación de la PKC en la activación plaquetaria es muy compleja, pudiendo ejercer una regulación positiva o negativa sobre diversos sistemas implicados en la estimulación: por un lado parece actuar como señal positiva para la secreción y agregación, pero al mismo tiempo interfiere la transducción de la señal entre el receptor y la PLasa-C.

4.1.4.- Fosforilación de proteínas plaquetarias

Durante la estimulación plaquetaria se producen numerosas fosforilaciones protéicas, entre las cuales cabe destacar:

4.1.3.1.- Cadena ligera de miosina (MLC), de 20 kDa, fosforilada por una quinasa dependiente del sistema calcio/calmodulina

4.1.3.2.- Proteína de 47 kDa (P-47), fosforilada por la PKC

4.1.3.3.- Proteínas fosforiladas por la PKA dependiente del AMPc (ver apartado 4.1.2.2.1.)

4.1.3.4.- Proteínas fosforiladas por una Quinasa dependiente del GMPc, con efecto inhibitorio sobre la funcionalidad plaquetaria (334).

4.1.3.5.- Proteínas fosforiladas por Tirosina-quinasa, de función todavía desconocida (117,118)

4.1.3.1.- Cadena ligera de miosina (MLC)

La estructura y regulación de la miosina plaquetaria son similares a las de la miosina de las células musculares lisas (335). Es una proteína asimétrica (460 kDa), compuesta por un par de cadenas pesadas (200 kDa) y dos pares de cadenas ligeras (20 y 15 kDa).

En las plaquetas en reposo, las cadenas ligeras de 20 kDa sólo están fosforiladas en un 10%; la estimulación con trombina induce la fosforilación de la MLC en un 90% (336,337,271). Esta fosforilación se produce por acción de una quinasa específica dependiente del sistema calcio/calmodulina, denominada quinasa de la cadena ligera de miosina, o MLCK (290,338,339). La unión de cuatro moléculas de calcio a la calmodulina conduce a la asociación del complejo calcio/calmodulina con la MLCK, que de esta forma resulta activada para seguidamente fosforilar a la cadena ligera de miosina (340,341).

La fosforilación y activación de la MLC induce un incremento significativo de la actividad ATP-asa de la actina (342), la disposición de la miosina en filamentos (343), y la asociación de la miosina con el citoesqueleto plaquetario (344). En estas condiciones se desarrolla una actividad contráctil como consecuencia del deslizamiento de los filamentos de miosina sobre los de actina (345); esta contracción es la principal responsable de las modificaciones de la membrana plasmática y de la centralización de gránulos secretores que experimentan las plaquetas durante el cambio de forma, favoreciendo así la subsiguiente exocitosis (20). Se ha sugerido que la MLC-activada interviene en la inducción inicial del cambio de forma, pero que no es necesaria para su mantenimiento (346).

4.1.3.2.- Proteína de 47 kDa

Como se ha mencionado anteriormente (apartado 4.1.3.2.), el sustrato principal de la PKC en plaquetas radica en una proteína de 47 kDa de identidad todavía desconocida.

La fosforilación de esta proteína se produce de forma más lenta que la fosforilación de la MLC (346), debido probablemente a que la formación de 1,2-DAG en cantidades suficientes para activar a la PKC requiere más tiempo que la generación del $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ necesario para activar a la MLCK (182).

La fosforilación de la P-47 parece estar estrechamente relacionada con la secreción plaquetaria (347), hasta tal punto que se han podido evidenciar dos grados distintos de fosforilación de la P-47 durante la activación plaquetaria: un nivel de fosforilación bajo durante el cambio de forma, y un nivel superior durante la secreción (209). Estos datos refuerzan la hipótesis de la participación de la PKC como señal positiva en la secreción plaquetaria (ver apartado 4.1.3.2.).

4.1.4.- Ensamblaje del citoesqueleto

Las plaquetas, al igual que la mayoría de las células eucariotas, contienen las proteínas contráctiles actina y miosina identificadas por primera vez en las células musculares (348). El sistema contráctil plaquetario es en muchos aspectos muy similar al de las células musculares lisas, hasta tal punto que las plaquetas han constituido un modelo muy útil para el estudio de la organización y regulación de las proteínas contráctiles.

La activación plaquetaria se acompaña de importantes cambios en la organización del citoesqueleto (349). Estos cambios incluyen:

- a) Agrupación y entrecruzamiento de los filamentos de actina
- b) Formación de filamentos de miosina
- c) Unión de miosina y actina

Los cambios del citoesqueleto son los principales responsables de la generación de actividad contráctil en las plaquetas activadas; la formación de acto-miosina parece ser un factor fundamental para que se pueda producir la centralización de gránulos y la esferización del contorno plaquetario, mientras que la polimerización de la actina parece estar implicada en la emisión de pseudópodos (16).

* En la Fig.8 se representa esquemáticamente un modelo bifásico de activación plaquetaria propuesto por Siess (7), en el cual se incluyen los principales parámetros de activación descritos anteriormente.

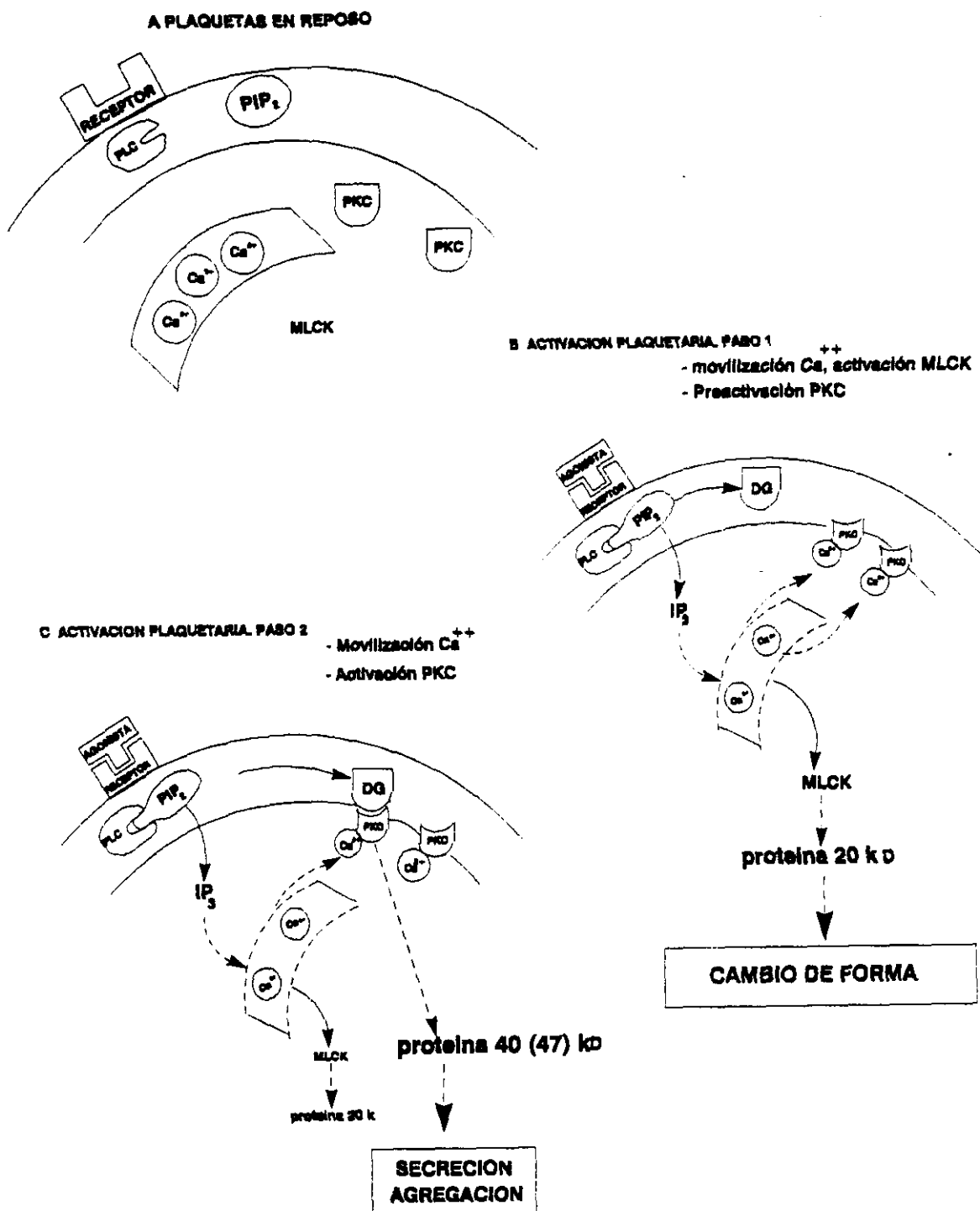


FIG. 8. MODELO BIFASICO DE ACTIVACION PLAQUETARIA

La primera fase de la activación incluiría la formación de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, la movilización intracelular de calcio y la fosforilación de la MLC. Estos fenómenos darían lugar al cambio de forma plaquetario. La movilización de calcio preactivaría a la PKC, traslocándola desde el citosol a la membrana plasmática para hacerla más asequible al 1,2-DAG.

La segunda fase consistiría en la activación de la PKC por el 1,2-DAG procedente mayoritariamente de la hidrólisis del PtdIns por una PLasa-C específica. La activación de la PKC estaría implicada en los procesos de secreción y agregación plaquetarias.

4.2. Activación plaquetaria por otras vías

Además de los agonistas plaquetarios fisiológicos que activan a las plaquetas por interactuar con receptores específicos, existen otros agentes capaces de inducir la estimulación plaquetaria por otras vías.

Un ejemplo clásico de estos agonistas afisiológicos está constituido por los ionóforos cálcicos, como el antibiótico A23187 y la ionomicina. Estos ionóforos mimetizan las respuestas plaquetarias inducidas por los agonistas fisiológicos; inducen cambio de forma, secreción y agregación (350,351). El A23187 y la ionomicina atraviesan la membrana plasmática, movilizándolo directamente el calcio de los depósitos intracelulares e incrementando así la concentración citosólica de calcio (352,353).

Los ionóforos cálcicos no se unen a receptores y no inducen la hidrólisis de polifosfoinosítidos; tampoco estimulan la formación de 1,2-DAG (165), de Ptd-OH (354) ni de inositol-fosfatos (166,355). No obstante, bajo determinadas condiciones de experimentación, los ionóforos cálcicos sí pueden provocar la hidrólisis de fosfoinosítidos por acción de la PLasa-C en plaquetas humanas; sin embargo, la estimulación de esta enzima no es inducida directamente por el ionóforo, sino que se produce de forma indirecta por acción de los endoperóxidos cíclicos y tromboxano A₂ generados como consecuencia del aumento de la concentración intracelular de calcio que estimula la actividad PLasa-A₂ (356,357,358).

Los ionóforos cálcicos también son capaces de inducir la fosforilación de la cadena ligera de miosina y en menor medida la de la proteína de 47 kDa (166,315), estimulando así la secreción y agregación plaquetarias en un grado similar al alcanzado por los agonistas fisiológicos.

5. METABOLISMO DEL ACIDO ARAQUIDONICO

La existencia del metabolismo del ácido araquidónico (20:4) en plaquetas fue descrita por primera vez por Smith y Willis en 1971 (359), añadiendo así las plaquetas a la larga lista de células capaces de sintetizar prostaglandinas (PGs).

Las plaquetas producen eicosanoides (metabolitos oxigenados activos del 20:4 y otros ácidos grasos esenciales relacionados) en respuesta a la estimulación por diversos agonistas. Los eicosanoides no se almacenan (360), por lo cual la presencia de estos compuestos en plaquetas implica su síntesis *de-novo* como consecuencia de la estimulación celular.

La síntesis de eicosanoides requiere la presencia de 20:4 en forma libre, no esterificado, ya que las enzimas oxigenantes (ciclooxigenasa y lipooxigenasa) no pueden actuar sobre un sustrato unido a fosfolípidos (361). Las plaquetas en reposo no contienen 20:4 libre, debido básicamente a una potente actividad araquidonil-Coenzima A-sintetasa que transfiere

el 20:4 a los fosfolípidos (362). Este hecho confiere una importancia fundamental al proceso de liberación de 20:4 durante la activación celular para que éste pueda ser posteriormente metabolizado. Las plaquetas humanas estimuladas con trombina (1U/ml) liberan 5-10 nmol de 20:4/10⁹ plaquetas (363). Esta cantidad de 20:4 representa solamente un 10% del total de 20:4 esterificado que existe en las plaquetas humanas (364), pero supone un gran incremento del nivel de 20:4 libre.

5.1. Composición y localización de los principales fosfolípidos plaquetarios

Los estudios de Marcus y col. (364) y de Cohen y col. (365) pusieron de manifiesto que el fosfolípido mayoritario en las plaquetas humanas es la Fosfatidilcolina (PC) (40% del total de fosfolípidos plaquetarios), seguido de la Fosfatidiletanolamina (PE) (30%). Estos dos fosfolípidos contienen aproximadamente el 80% del total de 20:4 plaquetario. Por otra parte, el PtdIns constituye únicamente un 5% de los fosfolípidos plaquetarios pero es un fosfoinosítido muy rico en 20:4, por lo que participa de forma importante en el metabolismo de este ácido graso.

La mayor parte de la PE plaquetaria se sitúa en la membrana plasmática mientras que PC y PtdIns están localizados mayoritariamente en las membranas internas (366), donde precisamente se localizan también las enzimas implicadas en la liberación y posterior metabolismo del 20:4 (367).

5.2. Vías de liberación de 20:4

5.2.1.- Vía Diglicérido-Lipasa / Monoglicérido-Lipasa

Esta vía implica la acción secuencial de una Diglicérido-Lipasa y una Monoglicérido-Lipasa sobre el 1,2-DAG generado durante la activación plaquetaria, para liberar el 20:4 que lleva esterificado en posición *sn*-2 (205,368).

Existen numerosas evidencias que parecen confirmar la existencia de esta vía de liberación de 20:4 en plaquetas:

- * Se ha demostrado la existencia de actividad diglicérido-lipasa en membranas plaquetarias (369).

- * La PLasa-C plaquetaria hidroliza específicamente los fosfoinosítidos que contienen 20:4 esterificado en posición *sn*-2, generando por tanto cantidades significativas de 1,2-DAG con estructura 1-acil,2-araquidonil- (169).

- * La inhibición de la diglicérido-lipasa provoca un acúmulo de 1,2-DAG tras la estimulación por trombina, lo cual parece indicar que en ausencia del inhibidor la lipasa es

activa (370). Asimismo, se ha demostrado que el pretratamiento de membranas plaquetarias caninas con un inhibidor específico de la diglicérido-lipasa (RHC-80267), reduce los niveles de 20:4 liberados tras la estimulación (371).

* En plaquetas humanas activadas con trombina se produce un acúmulo de 2-Monoacil-glicerol indicativo de la existencia de actividad diglicérido-lipasa (368,372).

Sin embargo, existen autores que niegan la importancia de esta vía de liberación de 20:4 en plaquetas, basándose en las siguientes observaciones:

- Agonistas que no inducen la hidrólisis de fosfoinosítidos (por ejemplo la epinefrina o el ionóforo cálcico A23187) liberan cantidades significativas de 20:4 (363).

- Otra serie de experimentos con inhibidores de la diglicérido-lipasa revelan que estos agentes reducen los niveles de 2-Monoacilglicerol formados tras la estimulación, pero no afectan al volumen de 20:4 liberado (372).

5.2.2.- Vía Fosfolipasa-A₂ (PLasa-A₂)

Como consecuencia de la activación plaquetaria, se produce un descenso considerable en la masa y contenido de 20:4 de diversos fosfolípidos de membrana (PC, PE y PtdIns), y de forma paralela un aumento de los niveles de liso-PC, liso-PE, liso-PtdIns y de 20:4 libre (373,374).

Estos cambios en los principales fosfolípidos de membrana son probablemente debidos a una actividad PLasa-A₂ (EC.3.1.1.4.) descrita por distintos autores en lisados de plaquetas (289,375).

La estimulación de la actividad PLasa-A₂ durante la activación plaquetaria parece depender de varios factores:

a) Calcio

La concentración de calcio es un factor crítico para la activación de esta enzima; su actividad es totalmente calcio-dependiente. Originalmente se pensaba que eran necesarias concentraciones de calcio en el rango milimolar para su activación (289), pero estudios más recientes (376) indican que la PLasa-A₂ de plaquetas de oveja muestra actividad a concentraciones de calcio más fisiológicas (0.3-0.8 μ M).

La liberación de calcio a partir del sistema tubular denso inducida por los agonistas plaquetarios es probablemente la señal que dispara la estimulación de la PLasa-A₂, constituyendo así un mecanismo por el cual los agonistas fisiológicos pueden inducir la activación secuencial de PLasa-C y PLasa-A₂. Sin embargo, parece que esta enzima también participa en la activación plaquetaria inducida por agonistas que no provocan aumentos

significativos de la concentración intracelular de calcio, como la epinefrina (25,144); este hecho sugiere la existencia de otros mecanismos reguladores independientes de los niveles citosólicos de calcio.

b) pH citosólico

El pH del citosol también es un importante regulador de la actividad PLasa-A₂; las condiciones óptimas para su activación requieren un pH alcalino. El incremento del pH citosólico durante la activación plaquetaria parece ser de unas 0.2-0.3 unidades (377,323); se desconoce si este aumento del pH es suficiente para activar a la PLasa-A₂ (289), cabiendo la posibilidad de que se pueda alcanzar un pH superior en áreas localizadas de la célula. La alcalinización del citoplasma que se produce durante la activación celular parece ser debida a la estimulación del intercambiador Na⁺/H⁺ de la membrana plasmática (378,379,380).

c) Inhibidores endógenos

Se ha descrito la existencia de un tercer factor regulador de la actividad PLasa-A₂ en plaquetas: algunos autores (381) postulan la existencia de un inhibidor endógeno, que podría estar constituido por algún miembro de la familia de Lipocortinas (311,382). Según esta hipótesis, la fosforilación de la Lipocortina por la PKC activada eliminaría su efecto inhibitorio sobre la PLasa-A₂.

d) Proteínas-G-reguladoras

Actualmente se está investigando la posibilidad de que la activación de la PLasa-A₂ esté mediada por una proteína-G-reguladora. Se han sugerido dos posibles mecanismos para la participación de proteínas-G en la activación de esta enzima:

* Según la primera hipótesis, la proteína-G implicada en la activación de la PLasa-A₂ sería la propia Gp mediadora de la hidrólisis de polifosfoinosítidos; los aumentos de la concentración citosólica de calcio inducidos por el Ins(1,4,5)P₃ serían en última instancia los responsables de la estimulación de la PLasa-A₂. Por lo tanto, esta sería una vía de activación de PLasa-A₂ dependiente de la activación previa de PLasa-C.

* La segunda hipótesis propone la activación directa de la PLasa-A₂ por una proteína-G todavía desconocida ("Gx").

Las primeras evidencias sobre la posible existencia de esta proteína "Gx" fueron obtenidas por Murayama y UI (383) al comprobar que el tratamiento de fibroblastos 3T3 con toxina-pertussis inhibía la liberación de 20:4 pero no la hidrólisis de polifosfoinosítidos en respuesta a la trombina. Otros autores han obtenido resultados similares en células tiroideas (384), demostrando además que ni la neomicina (inhibidor de la hidrólisis de fosfoinosítidos por unirse a los sustratos de la PLasa-C), ni los inhibidores de la Díglícrido-lipasa reducen la liberación de 20:4. Estos datos sugieren que el 20:4 movilizado durante la activación celular procede directamente de los fosfolípidos vía PLasa-A₂, sin necesidad de que se

produzca previamente la activación de la PLasa-C. Posteriormente se ha demostrado que el $GTP\gamma S$ estimula la actividad PLasa- A_2 en preparados de retina, y que esta activación es inhibida por la toxina-pertussis (385). Estos resultados indican la posible participación de una proteína-G sensible a toxina-pertussis en la activación de la PLasa- A_2 , existiendo evidencias de que la subunidad implicada en la estimulación de esta actividad enzimática es la subunidad β/γ y no la α .

Los estudios sobre la existencia de esta supuesta proteína-G-reguladora de PLasa- A_2 en plaquetas son mucho menos numerosos que los realizados en otros tipos celulares. Nakashima y col. (386) han podido inducir la liberación de 20:4 incubando plaquetas permeabilizadas con GTP y $GTP\gamma S$, sin que dicha liberación se viera afectada por la adición de un inhibidor de la diglicérido-lipasa. Otros autores (387) han estudiado la formación de $Ins(1,4,5)P_3$ y Tromboxano- B_2 en plaquetas intactas estimuladas con AlF_4^- , demostrando que en estas condiciones la neomicina y la PGE_1 inhiben la producción de $Ins(1,4,5)P_3$, pero no la de TxB_2 . Por otra parte, la incubación de las plaquetas con toxina-pertussis bloquea la síntesis de TxB_2 inducida por AlF_4^- sin afectar a la producción de $Ins(1,4,5)P_3$ (387).

En la Fig.9 se representan esquemáticamente los distintos factores reguladores de la actividad Plasa- A_2 en plaquetas.

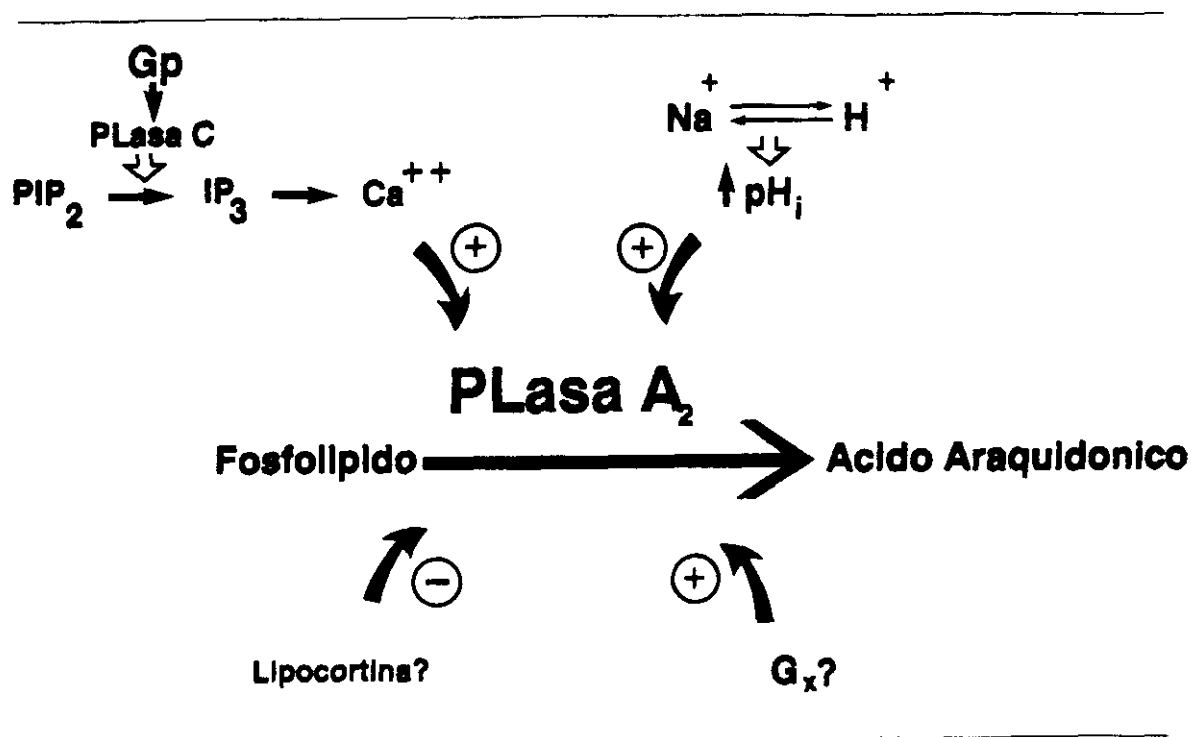


FIG. 9. POSIBLES MECANISMOS REGULADORES DE LA ACTIVIDAD FOSFOLIPASA- A_2 EN PLAQUETAS

ACTIVIDADES PL_{ase}-A₂ EN PLAQUETAS

Además de las actividades PL_{ase}-A₂ que liberan 20:4 inespecíficamente a partir de los principales fosfolípidos de membrana, se han descrito también en plaquetas dos actividades PL_{ase}-A₂ específicas para Ptd-OH y PtdIns.

a) PL_{ase}-A₂ específica para Ptd-OH:

Lapetina y col. (388,389) sostienen que el Ptd-OH es una de las principales fuentes para la liberación de 20:4 en plaquetas de caballo por acción de una PL_{ase}-A₂ específica, describiendo que la formación de Ptd-OH precede a la liberación de 20:4.

Sin embargo, otros autores han demostrado que en plaquetas humanas la formación de Ptd-OH tiene lugar *después* de la liberación de 20:4, contradiciendo así la hipótesis de Lapetina (362).

Esta discrepancia de resultados puede ser debida a la distinta procedencia de las plaquetas en ambos trabajos (caballo y humanos), ya que se ha sugerido que algunas rutas metabólicas celulares pueden diferir en las distintas especies animales.

b) PL_{ase}-A₂ específica para PtdIns

Esta actividad enzimática ha sido descrita en plaquetas humanas (363) y de caballos (358) estimuladas con ionóforo cálcico A23187 y/o trombina.

5.3. Metabolismo de 20:4 en plaquetas

Una vez liberado, el 20:4 plaquetario puede ser metabolizado por dos vías distintas, localizadas ambas en la membrana del DTS (367,390);

5.3.1.- Vía Lipooxigenasa (oxigenación en C-12)

5.3.2.- Vía Ciclooxygenasa (oxigenación en C-11 y C-15)

El metabolismo plaquetario del 20:4 aparece representado en la Fig.10

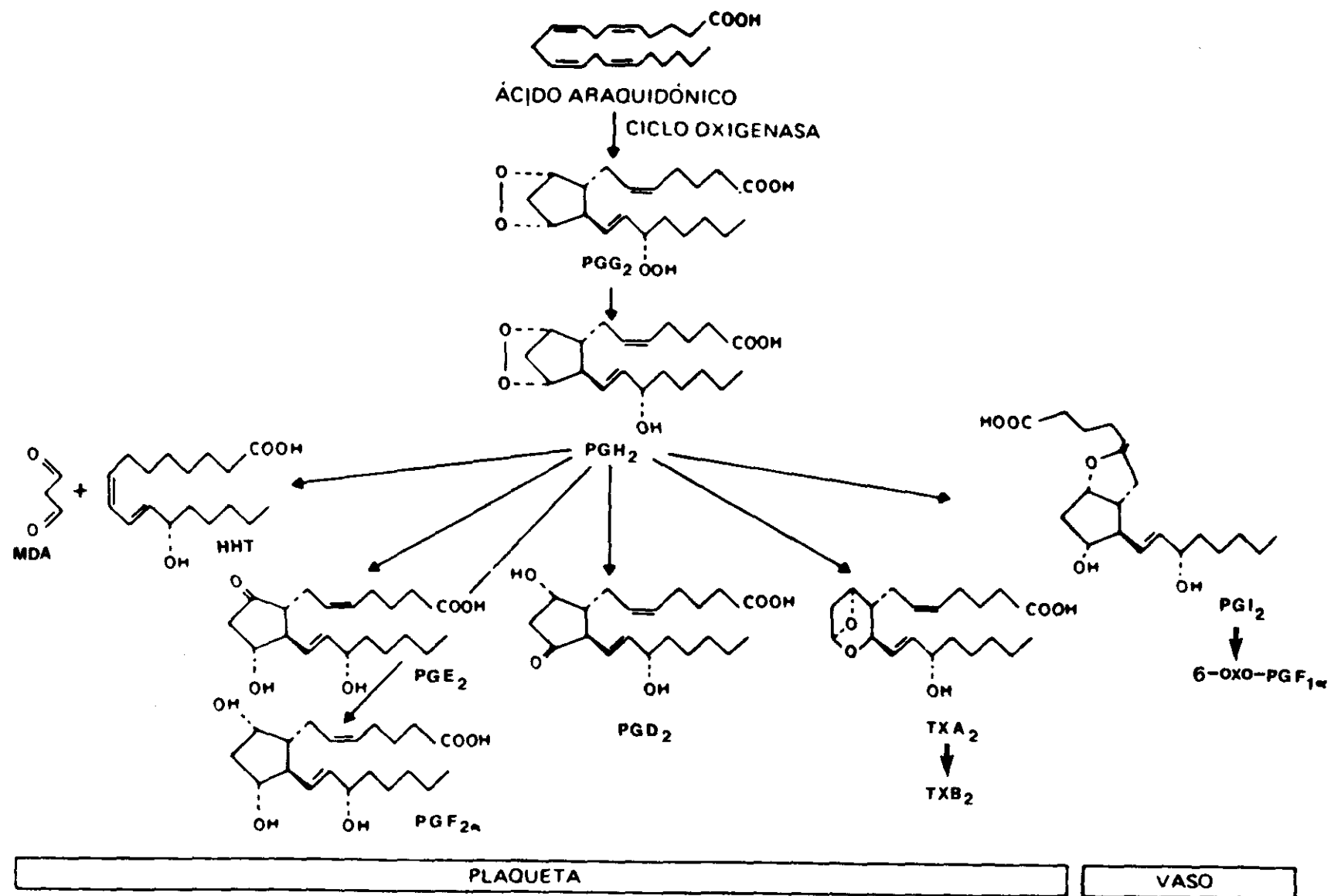


FIG. 10. METABOLISMO DEL ACIDO ARAQUIDONICO
(Vía Ciclooxygenasa)

5.3.1.- Productos de la vía Lipooxigenasa

Como consecuencia de la oxigenación del 20:4 en C-12 por la lipooxigenasa, se forma el ácido 12-hidroperoxeicosatetraenoico (12-HPETE), que será reducido por una peroxidasa dando lugar al ácido 12-hidroxeicosatetraenoico (12-HETE).

No se conocen con exactitud los efectos de estos metabolitos sobre la funcionalidad plaquetaria, aunque se ha podido demostrar que tanto el 12-HPETE como el 12-HETE poseen efectos inhibitorios sobre la agregación. A bajas concentraciones (dosis con el 50% de efecto inhibitorio máximo: $2\text{-}3\mu\text{M}$ para 12-HPETE (391) y $6\mu\text{M}$ para el 12-HETE (392)), antagonizan la agregación plaquetaria inducida por diversos agonistas . A concentraciones más elevadas ($15\text{-}25\mu\text{M}$), parecen inhibir el metabolismo del 20:4 por la vía ciclooxigenasa (393), posiblemente por bloquear directamente esta actividad enzimática (391).

5.3.2.- Productos de la vía Ciclooxigenasa

La vía ciclooxigenasa es la principal ruta metabólica del 20:4 en plaquetas (394).

La ciclooxigenasa plaquetaria posee actividad oxigenasa y peroxidasa. La actividad oxigenasa cataliza la oxigenación en C-11 y C-15, formando un endoperóxido cíclico inestable, la PGG_2 . La PGG_2 será rápidamente peroxidada convirtiéndose en otro endoperóxido inestable, la PGH_2 (la vida media de PGG_2 y PGH_2 es de unos 5 min a 37°C). La PGH_2 será degradada por vía enzimática o no-enzimática, dando lugar a distintos compuestos:

- * prostaglandinas estables (PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ y PGD_2)
- * otros derivados estables de 17- (ácido 12-hidroxi-5,8,10-heptadecatrienoico, HHT) y 3-átomos de carbono (malondialdehído, MDA)
- * un compuesto muy inestable (Tromboxano- A_2 , TxA_2) por acción de la Tromboxano-sintetasa; el TxA_2 (vida media en solución acuosa: 30 sg) será rápidamente transformado en su metabolito estable TxB_2 .
- * una prostaglandina inestable (prostaciclina, PGI_2) por acción de la prostaciclina-sintetasa; la PGI_2 se convertirá rápidamente en un producto estable, la 6-oxo- $\text{PGF}_{1\alpha}$.

Las plaquetas poseen escasa actividad PGI_2 -sintetasa, por lo que el producto principal del metabolismo de 20:4 en estas células es el Tromboxano- A_2 (88), importante potenciador de la hemostasia por su marcado efecto vasoconstrictor e inductor de la agregación plaquetaria (395). Por el contrario, las células endoteliales producen grandes cantidades de PGI_2 (potente inhibidor plaquetario por inducir incrementos del AMPc) al ser estimuladas. Este hecho condujo a Moncada y col. a sugerir que el equilibrio de la interacción plaqueta-endotelio está mediado por la acción de fuerzas opuestas: el TxA_2 como estimulante y la PGI_2 como

inhibidora de la activación plaquetaria (396). Según esta hipótesis, la homeostasia vascular viene determinada por el balance de la producción de TxA_2 y PGI_2 , siendo las trombosis patológicas el resultado directo de las alteraciones de este equilibrio vascular. Posteriormente se demostró que la interacción entre las plaquetas y las células endoteliales es aún más estrecha: Bunting y col (397) propusieron que los endoperóxidos cíclicos sintetizados por las plaquetas estimuladas son transferidos a la pared vascular, donde las células endoteliales los utilizan como sustrato exógeno para la formación de PGI_2 endógena. Este mecanismo sirve probablemente para limitar la agregación plaquetaria en los vasos lesionados, ya que favorece la formación de PGI_2 a expensas del TxA_2 . La producción de PGI_2 vascular a partir de los endoperóxidos derivados de las plaquetas ha sido posteriormente confirmada por otros autores (398,399).

Las prostaglandinas y los tromboxanos actúan como "hormonas locales" o *autacoides*, es decir, que su síntesis, actividades fisiológicas y subsiguiente inactivación por degradación metabólica, tienen lugar en las proximidades de la célula original (400). Entre los eicosanoides formados en las plaquetas por la vía ciclooxigenasa existen compuestos que actúan como inhibidores y otros que se comportan como estimulantes de la funcionalidad plaquetaria;

- La PGI_2 es un potente vasodilatador e inhibidor de la agregación plaquetaria (401,402); su unión a su receptor sobre la superficie plaquetaria (receptor que comparte con la PGE_1) activa a la proteína-Gs elevando así los niveles de AMPc intraplaquetario (ver apartado 4.1.2.2.1). Aunque la PGI_2 y la PGE_1 comparten el mismo receptor, el grado y cinética de estimulación de la adenilato-ciclasa que induce cada una de estas dos prostaglandinas son diferentes: los incrementos del AMPc originados por la PGI_2 son mayores y más sostenidos que los ocasionados por la PGE_1 (403).

- La PGD_2 posee efectos inhibitorios sobre la secreción y agregación, ya que su interacción con sus receptores plaquetarios estimula la formación de AMPc (404).

- La PGH_2 , la PGG_2 y fundamentalmente el TxA_2 actúan como estimulantes de la activación plaquetaria (88). Los Endoperóxidos y el TxA_2 pueden actuar como estímulos primarios o bien como intermediarios en la activación plaquetaria por agonistas exógenos. Una vez sintetizados a nivel del DTS plaquetario, estos compuestos difundirán a través de la membrana plasmática para salir al espacio extracelular y seguidamente unirse a receptores comunes sobre la superficie celular, constituyendo así un importante sistema de retroalimentación-positiva.

En cuanto a sus acciones como activadores plaquetarios directos, se ha demostrado que la unión del TxA_2 y de la PGH_2 a sus receptores reduce los niveles de AMPc intraplaquetarios, pero únicamente cuando éstos hayan sido previamente elevados por agentes estimulantes de la adenilato-ciclasa (405,406). Se ha comprobado asimismo que el TxA_2 y la PGH_2 estimulan la movilización intracelular de calcio en plaquetas (406), y si bien todavía no está claro por qué mecanismo, existen evidencias que indican la participación de una proteína-G-reguladora similar o idéntica a Gp: la capacidad de los análogos del TxA_2 para estimular la actividad GTPasa (91) y desencadenar una hidrólisis de polifosfoinosítidos

GDPβS-sensible (92) sugiere que el mecanismo amplificador de la respuesta plaquetaria ejercido por estos metabolitos activos del 20:4 está mediado por la activación de una proteína-G estimulante de la PLasa-C (proteína "Gp").

6. MECANISMOS DE REGULACION DE LA RESPUESTA PLAQUETARIA

6.1.- Mecanismos de regulación positiva

Para que las respuestas plaquetarias (fundamentalmente la formación de grandes agregados multicelulares irreversibles) puedan producirse con efectividad y rapidez, resulta necesaria la puesta en marcha de mecanismos amplificadores de las respuestas iniciales.

Las plaquetas poseen dos mecanismos principales de amplificación: Los sistemas de regulación positiva y la acción sinérgica de los agonistas.

6.1.1.- Sistemas de retroalimentación-positiva

Los sistemas de retroalimentación-positiva que se ponen en marcha durante la activación plaquetaria, son fundamentalmente dos:

- 1.) Formación de endoperoxidos cíclicos y Tromboxano-A₂ (407,408,35,209).
- 2.) Liberación de ADP durante la reacción de secreción (409,410,35).

Estos compuestos actúan como amplificadores de las respuestas plaquetarias iniciales, ya que una vez liberados al espacio extracelular por las plaquetas activadas, se unirán a receptores de membrana específicos, estimulando la hidrólisis de fosoinositidos, movilización de calcio, fosforilación de proteínas y exposición de receptores para fibrinógeno, transformando así las respuestas iniciales reversibles en respuestas irreversibles (411).

Sin embargo, ninguno de estos sistemas amplificadores está implicado en las respuestas plaquetarias primarias reversibles (adhesión, cambio de forma y primera onda de agregación) (24,25). Durante estas respuestas primarias puede producirse la liberación de ácido araquidónico, pero sin la formación de sus metabolitos activos (412,25,38).

En general, las concentraciones altas de agonistas fuertes (trombina, colágeno) son capaces de inducir directamente la activación plaquetaria sin necesitar la mediación de estos mecanismos amplificadores (407,413). Sin embargo, las concentraciones bajas de trombina

o colágeno, los agonistas intermedios (como PAF, vasopresina, o análogos de los endoperóxidos), y los agonistas débiles (como la epinefrina) dependen parcial- o totalmente de la formación de endoperóxidos y TxA₂ y/o de la liberación de ADP para poder inducir una activación plaquetaria completa (407,412,25).

6.1.2.- Acción sinérgica de agonistas

La mayoría de los agonistas plaquetarios actúan de una manera sinérgica (414).

Concentraciones subcríticas de distintos agonistas que por sí solas serían incapaces de inducir la activación plaquetaria, provocan una respuesta completa si se añaden conjuntamente a una suspensión de plaquetas (415,416,417,408).

Este sinergismo entre los distintos agonistas plaquetarios puede tener una gran importancia fisiológica, ya que posibilita la estimulación por agonistas que en condiciones fisiológicas nunca llegarían a alcanzar las concentraciones necesarias para inducir la activación plaquetaria por sí solos (418,419).

6.2.- Mecanismos de regulación negativa

La existencia de mecanismos fisiológicos inhibidores de la activación plaquetaria resulta imprescindible, ya que de otro modo la estimulación ilimitada de estas células daría lugar a procesos trombóticos incontrolados que podrían llegar a tener un curso mortal.

Los principales agentes implicados en la regulación negativa de la activación plaquetaria son el AMP cíclico y la proteína-quinasa-C.

6.2.1.- AMP cíclico (AMPc)

El AMPc inhibe la activación plaquetaria a varios niveles (ver apartado 4.1.2.2.1.), por lo cual todos los agentes que induzcan la estimulación de la adenilato-ciclasa en plaquetas tendrán efectos inhibitorios sobre la funcionalidad de estas células.

6.2.2.- Proteína-quinasa-C

Los mecanismos inhibidores de la PKC sobre la activación plaquetaria ya han sido descritos en el apartado 4.1.3.2.

En la Fig.11 aparece un esquema de los mecanismos de regulación positiva y negativa implicados en los fenómenos de activación plaquetaria.

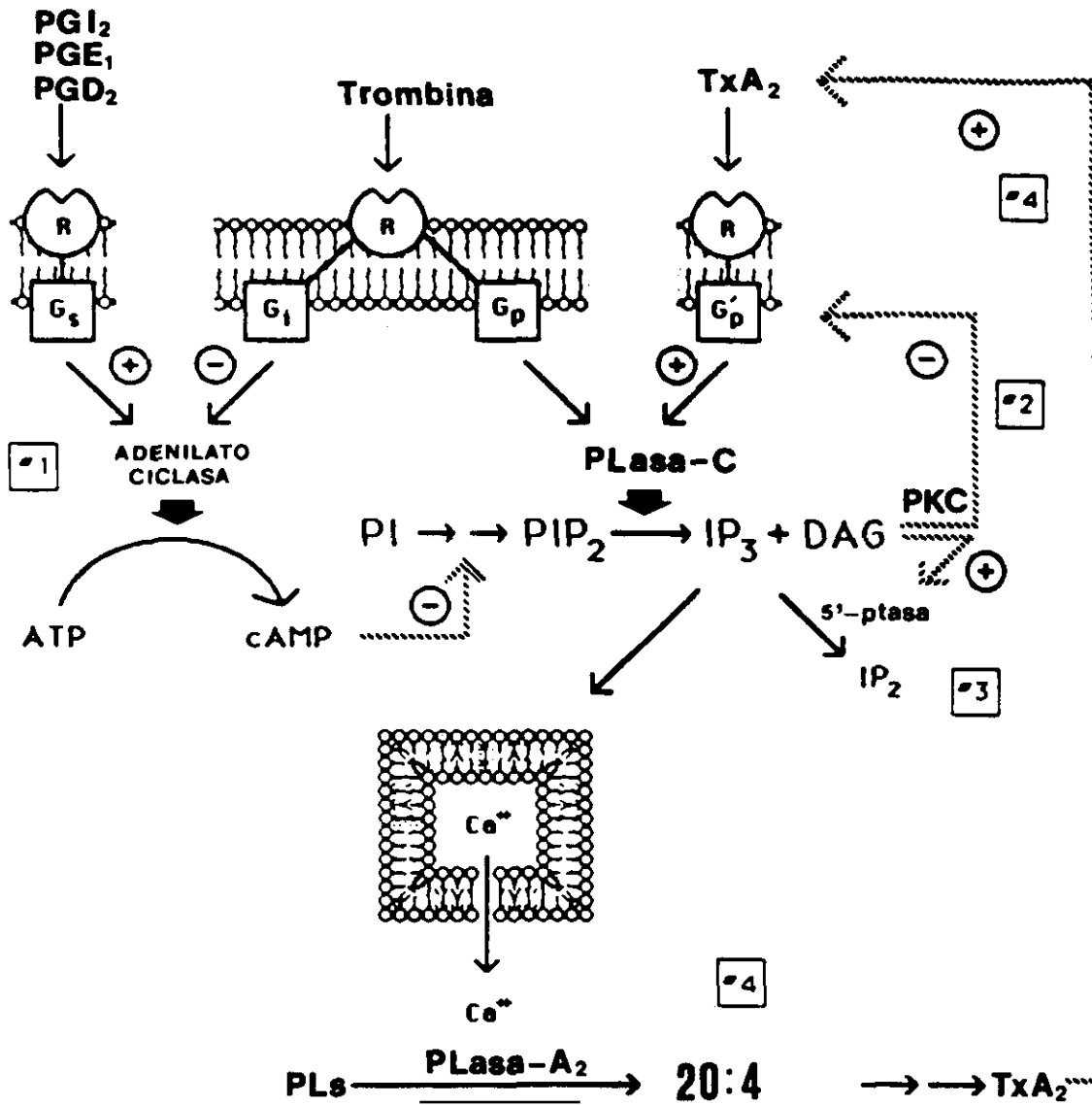


FIG. 11. MECANISMOS DE REGULACION DE LAS RESPUESTAS PLAQUETARIAS
Regulación negativa: 1. Los aumentos del AMPc inhiben la activación plaquetaria, fundamentalmente por interrumpir la resíntesis de PtdIns(4,5)P₂ al bloquear la PtdIns(4)P-Kinasa. 2. La PKC activada interfiere el acoplamiento del receptor a la proteína-Gp. 3. La posible estimulación de la Ins(1,4,5)P₃-fosfatasa por la PKC acelera el metabolismo del Ins(1,4,5)P₃.
Regulación positiva: 4. Los metabolitos oxigenados activos del 20:4 actúan como sistema de retroalimentación positiva al potenciar la hidrólisis de polifosfoinosítidos.

MATERIALES Y METODOS

1. MATERIALES

1.1. Material biológico

Las plaquetas fueron obtenidas de perros mestizos de ambos sexos, con edades comprendidas entre 2-6 años.

Todos los animales fueron sometidos a controles hematológicos y bioquímicos completos antes de las extracciones, excluyéndose del estudio todos aquellos que presentaran alguna alteración de los parámetros normales para la especie.

1.2. Productos radiactivos

Acido (5,6,8,9,11,12,14,15-³H)-araquidónico (1mCi/ml, 120 Ci/mmol); ácido-1(¹⁴C)-araquidónico (50 μ Ci/ml, 60 mCi/mmol); (2-³H)-glicerol (1mCi/ml, 0.1-1 Ci/mmol); (³H)-5-hidroxitriptamina (serotonina-(³H)) (1mCi/ml, 90 Ci/mmol); mio-(2-³H)-inositol (1mCi/ml, 50 Ci/mmol).

Todos estos productos fueron adquiridos de Amershan, U.K. (Nuclear Ibérica, S.A.)

1.3. Lípidos

Algunos de los lípidos utilizados como patrones, (1,2-Dioleil-*sn*-glicerol (C18:1, *cis* 9), ácido L- α -fosfatídico, dipalmitoil; L- α -fosfatidil-colina, dipalmitoil; L- α -fosfatidil-L-serina (de cerebro bovino), L- α -fosfatidil-etanolamina, dipalmitoil; ácido araquidónico, sal sódica (de hígado porcino)), fueron adquiridos a Sigma Chemical Co., USA.

Otros lípidos (PtdIns(4,5)P₂, PtdIns(4)P, PtdIns, todos ellos de cerebro bovino, y Ptd-OH de yema de huevo) nos fueron donados gentilmente por el Dr. E.R.S. Roldán (IAPGRC, Cambridge, GB).

Los lípidos fueron reconstituídos en el volumen adecuado de una mezcla de cloroformo:metanol (1:1), y conservados a -20°C en atmósfera de N₂.

1.4. Material para cromatografía

Para la separación de lípidos mediante cromatografía de adsorción en capa fina (TLC), se utilizaron cromatoplasas de Silica Gel G (DC-Fertigplatten Kieselgel 60-F₂₅₄, 0.25 mm) y cromatofolios de Silica Gel G (DC-Plastikfolien Kieselgel 60, 0.2 mm), de Merck, Darmstadt, Alemania.

1.5. Material para Autorradiografía

Películas radiográficas ortocromáticas Valca SHX-55; revelador "Universal Valca"; fijador "Universal Valca"; chasis para radiografía con placas reforzadoras Siemens.

1.6. Otros reactivos y materiales

1.6.1.- Material plástico

Tubos de centrífuga de polialómeros de 30 ml, de Beckman.

Pipetas Pasteur de 3ml y pipetas de 10 ml estériles, de Costar.

Tubos de polipropileno de 5 ml, de Daslab.

Cánulas de teflón estériles para extracción de sangre, VASOCAN (Braunüle), 1.2 mm/18G. x 45 mm, de B.Braun, Alemania.

Viales de centelleo de polipropileno Beckman Poli-Q y LKB standard.

1.6.2.- Bolsas para extracción de sangre

Bolsas de transferencia estériles y apirógenas "Kawasumi", de 300 y 500 ml.

1.6.3.- Otros reactivos químicos

De Sigma Chemical Co., USA: albúmina bovina inactivada y libre de ácidos grasos, hepes, EGTA, saponina, sulfato de neomicina, ATP, GTP γ S, β GDP, ionóforo cálcico A23187, indometacina, quinacrina, prostaciclina, azul de Coomassie-R.

De Serva : Acido cacodílico (sal sódica).

De Dade Grifols,S.A.: α -trombina bovina.

De Laboratorios Knickerbocker,S.A.E (Barcelona): "Plaquet-CROM" (Reactivos Cromatest).

De Merck, Darmstadt (Alemania): NaF, Dimetilsulfóxido, Azul Tripan, todos los solventes utilizados para las separaciones de lípidos (cloroformo, isooctano, éter dietílico, etc), 1,2-propileno óxido (para microscopía electrónica), y el resto de ácidos, bases y sales empleadas en las preparaciones y ensayos (nivel de reactivos para análisis).

De Bio-Rad,USA: resinas de intercambio aniónico AG 1-X8 forma formiato (200-400 Mesh); columnas de polipropileno para cromatografía "Poly-Prep", con capacidad para 2 ml de medio cromatográfico y 10 ml de reservorio.

De Laboratorios Virbac (Barcelona): "Zoletil" (anestésico de uso veterinario)

De Beckman: cóctel de centelleo biodegradable "Ready-Safe" .

1.7. Equipo

Baño de agua termostatzado con agitaci3n New Brunswick Scientific, modelo G76/D; balanzas anal3ticas Sauter; estufas Memmert; agitadores rotatorios Atom y agitatu3os Clay-Adams; centr3fuga de mesa Heraeus Labofuge I; centr3fuga Orto Tornax; microfuge Kubota KM-15200; espectrof3t3metro Beckman DU-20; densit3metro CAMAG 76610; microscopio electr3nico de transmisi3n Jeol 100-B; microtomo Ultratome III (LKB); microscop3a 3ptica convencional, Olympus BH-2 y Leitz SM-LUX; agreg3metro "Whole-Blood-Lumiaggregometer" Chrono-Log Model-500 (Chrono-Log Corp., USA), con registrador de doble canal Chrono-Log Model-703 (Chrono-Log Corp., USA); contador de centelleo Beckman LS 3801; contador de centelleo LKB-WALLAC (Mod. 1215-Rackbeta II); contador celular Sysmex F-800, con diluidor autom3tico Sysmex DD-100.

2. METODOS

2.1.- Aislamiento de plaquetas sanguíneas

Las extracciones de sangre se realizaron mediante cateterización de la arteria femoral; los perros fueron tranquilizados previamente mediante la administración por vía intramuscular de una mezcla de Tiletamina y Zolazepam (1:1) ("Zoletil"), a dosis de 5 mg/kg.

Para la cateterización de la arteria femoral se utilizaron cánulas de teflón (diámetro 1.2 mm), puncionándose la arteria por vía percutánea a nivel de la región inguinal.

La sangre fue recogida en bolsas estériles que contenían como anticoagulante ACD (ácido cítrico 71 mM, citrato sódico 180 mM, glucosa 111 mM) en una proporción del 10%.

Las plaquetas fueron aisladas por centrifugación diferencial de acuerdo al procedimiento descrito por Siess y col. (209).

La sangre se centrifugó a 200xg durante 20 min a temperatura ambiente, recogándose seguidamente el sobrenadante (Plasma Rico en Plaquetas, PRP). En este momento se tomaban alícuotas del PRP para el conteo de plaquetas y evaluación de su viabilidad.

A continuación, se incubó el volumen adecuado de PRP en distintas condiciones según los ensayos, siempre a 37°C en agitación.

Una vez completada la incubación, se centrifugó el PRP a 800xg durante 15 min a temperatura ambiente, despreciándose el sobrenadante (Plasma Pobre en Plaquetas, PPP), y resuspendiéndose el precipitado (plaquetas) en un volumen abundante de tampón Tris-Citrato-Bicarbonato (ClNa 129mM, ClK 2.8mM, Cl₂Mg 1.8mM, glucosa 5.5mM, CO₃HNa 8.5mM, citrato sódico 10.9mM, fosfato potásico 0.8mM, Tris-base 10mM, EGTA 2mM, BSA 0.1%; pH=6.9). A continuación, se realizaron 3 lavados en tampón-Tris-Citrato-Bicarbonato en las mismas condiciones de centrifugación, resuspendiéndose finalmente las plaquetas en el volumen adecuado de tampón.

Antes de cada centrifugación, se añadió PGI₂ (450 ng/ml) a la suspensión de plaquetas para evitar la agregación espontánea.

Después del último lavado y antes de realizar los ensayos, se tomaba una alícuota para conteo y evaluación de la viabilidad, ajustándose la concentración celular de forma adecuada según el experimento a realizar.

2.2.- Recuento de plaquetas y valoración de su viabilidad

2.2.1.- El recuento de plaquetas se realizó según los casos, en un contador celular automático (Sysmex F-800), o en un hemocitómetro (cámara de Neubauer).

Para el conteo en hemocitómetro, se realizaba una dilución 1/100 de la suspensión de plaquetas en "Plaquet-CROM" (solución compuesta por un colorante y una sustancia para lisar los eritrocitos).

2.2.2.- Para valorar la viabilidad de las plaquetas, se realizó una dilución 1/100 de la suspensión celular en una solución de Azul Tripan al 0.4% (p/v) disuelto en tampón fosfato (pH=7.2), que se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 min, procediéndose luego a su conteo en un hemocitómetro diferenciando las células teñidas de las no teñidas (las células teñidas son células no-viables). El % de viabilidad se calculó a partir de la expresión:

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{100 \times \text{células viables (no teñidas)}}{\text{células viables} + \text{células no viables}}$$

2.3.- Incubación y estimulación de plaquetas

2.3.1- Incubación de PRP

El PRP se incubó a 37°C en agitación (100 rpms), durante distintos períodos de tiempo dependiendo del experimento a realizar.

Las incubaciones con ³H-5-HT, fueron siempre de 90 min.

Las incubaciones con ¹⁴C-20:4, ³H-20:4, y ³H-Gly, se realizaron durante 150 min.

2.3.2.- Incubación de plaquetas aisladas en tampón Tris-citrato-bicarbonato

Las incubaciones con ³H-mio-Ins se realizaron en tampón tris-citrato-bicarbonato durante diversos períodos de tiempo (que oscilaron entre 90-180 min), con el fin de establecer el tiempo de incubación adecuado para alcanzar una incorporación óptima de ³H-Ins (ver capítulo de resultados).

Durante las incubaciones, se añadió PGI₂ cada 45 min (450 ng/ml) disuelta en un volumen de etanol que nunca sobrepasó el 0.1% del volumen final, con el fin de prevenir la agregación espontánea.

2.3.3.- Reacciones de estimulación de plaquetas

Las estimulaciones se realizaron siempre con plaquetas aisladas en el tampón correspondiente, después de haber sido lavadas 3 veces para eliminar el isótopo no incorporado.

La concentración de plaquetas en el tampón se ajustó siempre a 4×10^8 /ml (excepto en los experimentos con plaquetas permeabilizadas donde la concentración fue de 2×10^8 /ml), realizándose las estimulaciones sobre muestras de 0.5 ml.

Todas las reacciones de estimulación se realizaron a 37°C en agitación, en presencia o ausencia de calcio según los ensayos; la concentración de calcio en el medio se ajustó mediante el uso de tampones Ca^{2+} /EGTA como describe Raaflaub (420).

El volumen del estimulante añadido nunca superó el 0.1% del volumen final de la muestra.

2.4.- Permeabilización de plaquetas

Las plaquetas lavadas fueron sedimentadas siguiendo el procedimiento descrito por Siess y col. (209), siendo resuspendidas seguidamente en un tampón de características citosólicas (MgCl_2 5 mM, KCl 120 mM, Hepes 20 mM; pH=7.4) que contenía BSA al 0.1%, en presencia o ausencia de MgATP dependiendo del ensayo a realizar.

Las plaquetas (2×10^8 /ml) fueron permeabilizadas mediante la incubación con saponina (15 $\mu\text{g/ml}$) en el citado tampón durante 1 min.

Para comprobar el grado de permeabilización alcanzado y detectar posibles alteraciones de la fisiología plaquetaria tras el tratamiento con saponina, se determinaron los niveles de ciertas enzimas citosólicas liberados al medio. La actividad catalítica de la Láctico-Deshidrogenasa (LDH) se estableció mediante la medición de la oxidación de NADH^+ (condiciones de ensayo de la Sociedad Alemana de Química Clínica (421)). Los resultados obtenidos fueron comparables a los descritos en la bibliografía para diversos protocolos de permeabilización (231,248), demostrándose así la eficacia del procedimiento aplicado en nuestro estudio.

2.5.- Determinación de la secreción de serotonina (5-HT)

La determinación de la secreción de serotonina en plaquetas marcadas con ^3H -5-HT, se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Lapetina y col. (388).

Las incubaciones fueron frenadas por la adición de 0.5 volúmenes de glutaraldehído al 6% (p/v). A continuación se centrifugaron las plaquetas a 10.000xg durante 5 min a 4°C, tomándose seguidamente una alícuota de 100 μl del sobrenadante para conteo de radiactividad.

2.6.- Extracción de lípidos totales

La extracción de lípidos totales a partir de una suspensión de plaquetas, se realizó de acuerdo al procedimiento clásico de Bligh y Dier (422), siguiendo las modificaciones del método descritas por Roldán y col. (423), que se detallan a continuación:

Las estimulaciones de las plaquetas marcadas con ^{14}C -20:4, ^3H -20:4 ó ^3H -Gly, fueron frenadas por la adición de 1 vol de ácido perclórico al 10%.

Seguidamente, se centrifugaron las muestras a 1000xg durante 5 min, eliminándose el sobrenadante. A continuación se añadieron 2.5 vol de ácido perclórico al 5%, y se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones. Después de eliminar el sobrenadante, se añadieron 3.75 vol de una solución compuesta por: cloroformo/ metanol/ HCl concentrado (1/2/0.012 , v/v/v). Seguidamente se centrifugaron las muestras en iguales condiciones que anteriormente, pero en esta ocasión se recogió el sobrenadante y se transfirió a otro tubo, al que se añadió por este orden: agua destilada (1 vol), EDTA 100mM pH=7 (0.25 vol), NaCl 0.16 M (1.25 vol) y cloroformo (1.25 vol). A continuación se centrifugó de nuevo, obteniéndose dos fases bien diferenciadas: se eliminó la fase acuosa superior, y se reextrajo la fase orgánica inferior por la adición de 2 vol de la mezcla: cloroformo/ metanol / HCl 1 N (3/48/47 , v/v/v). Después de centrifugar, se eliminó de nuevo la fase superior, evaporándose la fase orgánica bajo nitrógeno. Seguidamente se resuspendió el extracto en un volumen conocido de cloroformo (1 ml), tomándose 2 alícuotas de cada muestra para conteo de radiactividad.

A lo largo de todo el proceso de extracción, las muestras se agitaron en un Vortex hasta su completa homogeneización tras la adición de las distintas soluciones.

Los extractos lipídicos se conservaron en una atmósfera de nitrógeno a -20°C hasta su utilización.

2.7.- Aislamiento de lípidos de hígado de rata

En la mayoría de los ensayos, los lípidos utilizados como patrones habían sido extraídos a partir de hígado de rata.

La extirpación del hígado de la rata se realizó inmediatamente después de la muerte del animal, homogeneizándose seguidamente la víscera en una solución de sacarosa 0.32 M al 30% (p/v). El homogeneizado fue filtrado a través de gasa doble, extrayéndose a continuación los lípidos totales siguiendo el protocolo descrito en el apartado anterior.

Una vez completado el procedimiento de extracción hasta la última centrifugación, se filtraron las dos fases a través de papel Whatman del número 1, y se dejaron reposar durante 12 horas a 4°C bajo atmósfera de nitrógeno.

Transcurrido ese tiempo, se eliminó la fase superior, evaporándose la fase orgánica inferior bajo nitrógeno; los lípidos totales contenidos en el extracto final fueron aplicados en

placas de TLC que se desarrollaron en distintos sistemas de solventes dependiendo de los lípidos que se quisieran separar (ver apartado 2.8.).

Una vez reveladas las manchas lipídicas por acción de vapores de yodo, se rasparon las correspondientes a los lípidos que se pretendían aislar. Los lípidos fueron extraídos posteriormente de la Silica-Gel con cloroformo, cloroformo/metanol (2:1 v/v), cloroformo/metanol (1:1 v/v), y metanol. Finalmente, los extractos se llevaron a sequedad y se resuspendieron en cloroformo/metanol (1:1 v/v), conservándose bajo nitrógeno a -20°C hasta su utilización.

2.8.- Separación de lípidos

Los lípidos fueron separados por cromatografía de adsorción en capa fina (TLC), utilizando distintos sistemas de solventes. En todos los casos, los extractos lipídicos se resuspendieron en 50 µl de cloroformo que seguidamente se aplicaron en las placas de TLC.

Los sistemas de solventes empleados fueron los siguientes:

2.8.1.- Separación de lípidos neutros (424):

Hexano / éter dietílico / ácido acético
(60 / 40 / 1 ; v/v/v)

2.8.2.- Separación de ácido fosfatídico, ácidos grasos libres, TxA_2 , 12-HETE y HHT (425):

Se utiliza como sistema de desarrollo la fase superior de la mezcla;

Acetato de etilo / Isooctano / ácido acético / agua
(90 / 50 / 20 / 100 ; v/v/v/v)

2.8.3.- Separación de Fosfoinosítidos y otros Fosfolípidos (426):

Se utilizó un sistema mono- o bidimensional dependiendo de los fosfolípidos que se pretendieran separar.

a) Sistema Monodimensional:

Para la separación monodimensional se utilizaron placas de TLC de 20 x 20 cm impregnadas con EDTA 100 mM (pH=7.0), que se desarrollaron en el sistema:

Cloroformo / metanol / agua / NH_3 concentrado
(48 / 40 / 7 / 5 ; v/v/v/v)

b) Sistema Bidimensional:

Para la separación en dos dimensiones se utilizaron cromatofolios de 10 x 10 cm previamente impregnados con oxalato potásico al 1% (p/v); como primer sistema de solventes se empleó el descrito en el apartado a), y una vez secas las placas, se corrieron nuevamente en el sistema:

Cloroformo / metanol / ácido fórmico
(55 / 25 / 5 ; v/v/v)

2.8.4.- Separación de Fosfolípidos y ácidos grasos libres (427):

Cloroformo / metanol / agua / ácido acético
(65 / 50 / 5 / 2 ; v/v/v/v)

2.8.5.- Detección de las manchas lipídicas:

Después de desarrollar las placas de TLC en los respectivos sistemas de solventes, las manchas correspondientes a los distintos lípidos se revelaron por los siguientes métodos:

2.8.5.1.- Sometiendo las placas de TLC a vapores de yodo.

2.8.5.2.- Por autorradiografía de las placas

2.8.5.3.- Por tinción de las placas de TLC durante 30 min con una solución colorante compuesta por:

Azul de Coomassie-R ...	0.3 g
Metanol	300 ml
NaCl	5.8 g
Agua	Hasta 1 l

Las placas fueron decoloradas seguidamente con metanol al 30 % durante 5 min.

En la Fig. 12. se muestra el orden de migración de los distintos lípidos en los sistemas de solventes citados anteriormente.

FIG. 12. SEPARACION DE LIPIDOS EN DISTINTOS SISTEMAS DE SOLVENTES (AUTORRADIOGRAFIA)

12a.: Separación de ác. fosfatídico (PA), ác. grasos libres (AGL), TxB₂, 12-HETE y HHT (2.8.2.)

(PLs: Fosfolípidos) (La autorradiografía corresponde a un experimento representativo con plaquetas estimuladas por trombina (2U/ml) y ionóforo A23187 (10µM); reacciones frenadas a distintos tiempos)

12b.: Separación de lípidos neutros: 1,2-MAG, 1,2-DAG, 1,3-DAG, ác. grasos libres (AGL) y triglicéridos (TG) (2.8.1.). (La autorradiografía corresponde a un experimento representativo con plaquetas estimuladas por trombina (U/ml); reacciones frenadas a distintos tiempos)

FIG. 12a.

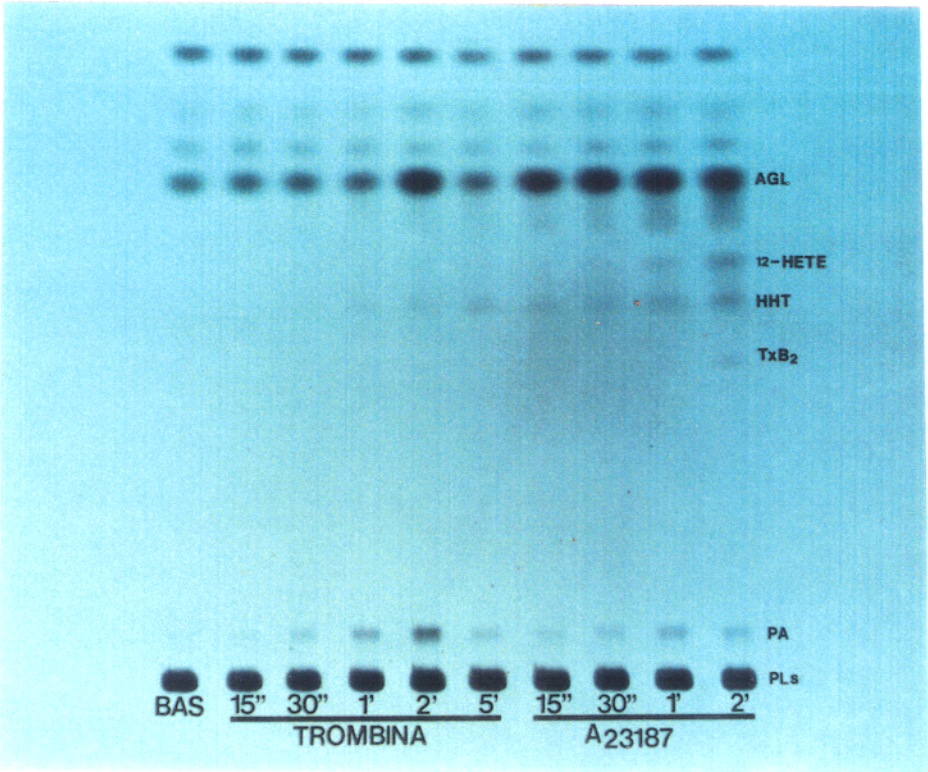
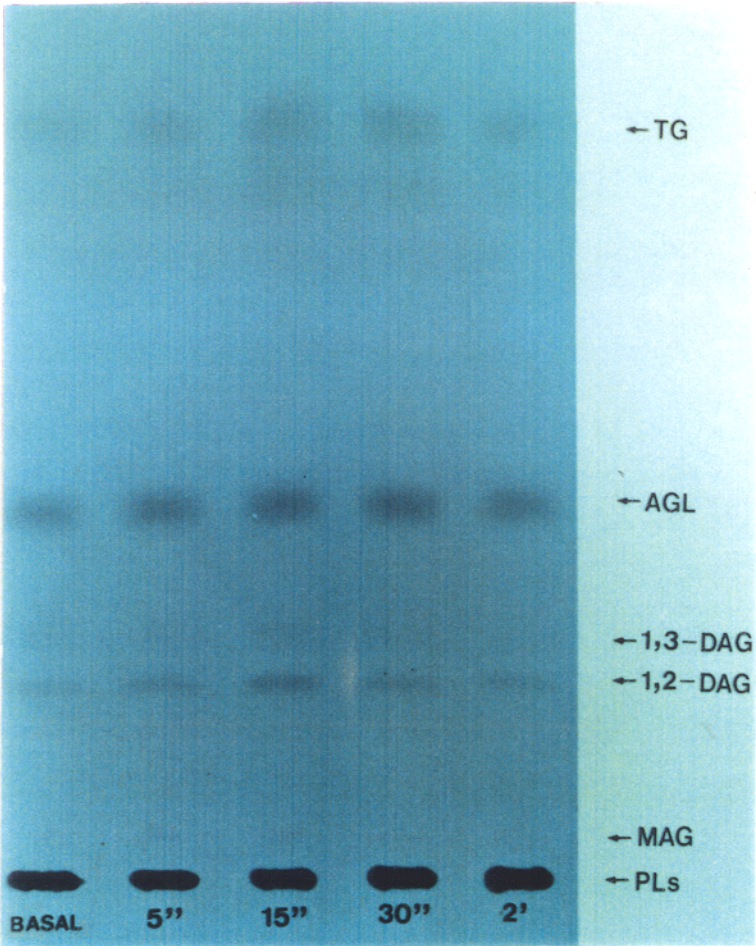
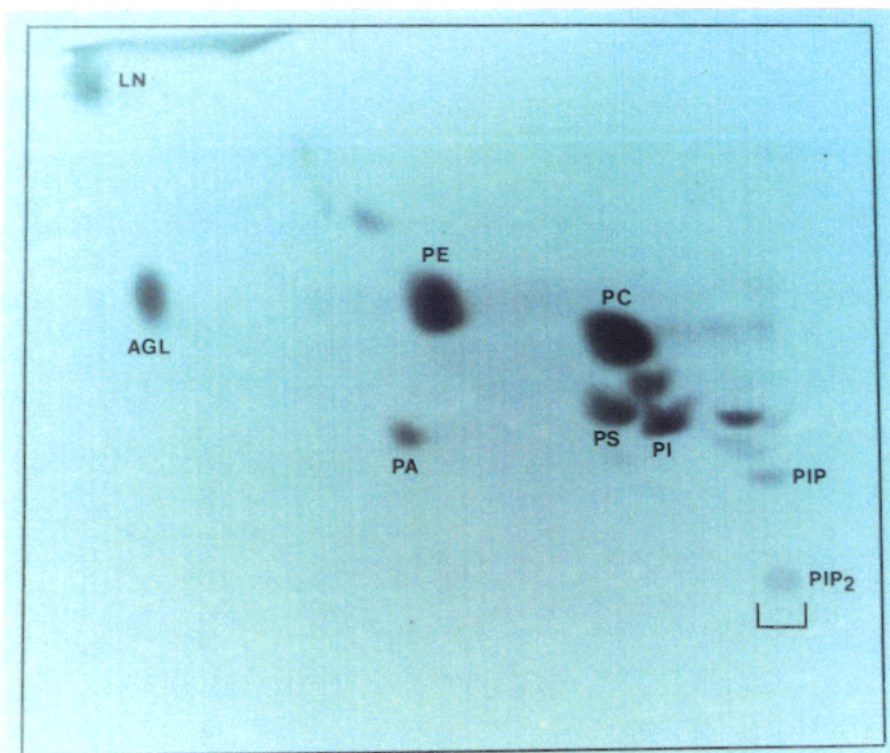


FIG. 12b.





12c.: Separación de fosfoinosítidos y otros fosfolípidos (Sistema Bidimensional, 2.8.3) (PIP₂: PtdIns(4,5)P₂, PIP: PtdIns(4)P, PI: PtdIns, PC: Fosfatidilcolina, PS: Fosfatidilserina, PA: ác. fosfatídico, PE: Fosfatidiletanolamina, AGL: ác. grasos libres, LN: Lípidos neutros). (La autorradiografía corresponde a un experimento representativo con plaquetas estimuladas por trombina (2U/ml); reacción frenada al cabo de 1 min post-estimulación)

2.9. Autorradiografía

La autorradiografía se llevó a cabo poniendo en contacto las cromatoplasas de TLC, con película radiográfica ortocromática VALCA SHX-55. El tiempo de exposición vino dado en cada caso por la radiactividad presente, siendo por regla general de unos 10-15 días (a -20°C) para las placas marcadas con ¹⁴C.

El revelado de las placas se realizó manualmente, por las técnicas fotográficas convencionales.

2.10.- Aislamiento y separación de Inositoles-Fosfato

2.10.1.- Aislamiento de Ins-Ps

Los InsPs fueron aislados según el método descrito por Irvine y col (428).

Las reacciones se frenaron mediante la adición a las muestras de 1 volumen de ácido tricloroacético al 20% (p/v), manteniéndose a 4°C durante 30 min para facilitar la precipitación de las proteínas. Posteriormente se realizaron 4 lavados centrifugando a 1000xg durante 10 min con 4 volúmenes de éter dietílico, eliminándose la fase superior después de cada centrifugación. Tras el último lavado se ajustó el pH de las muestras a 7, mediante la adición de Tris-Base 100 mM.

2.10.2.- Separación de Ins-Ps

La separación de los distintos Ins-Ps se realizó mediante fraccionamiento por cromatografía de intercambio aniónico en columnas de resina AG 1-X8 , siguiendo el procedimiento descrito por Irvine y col (428) y Berridge y col (429).

Antes de aplicarse las muestras, se empaquetaron las columnas de polipropileno con resina AG 1-X8 de intercambio aniónico forma formiato (200-400 Mesh), hasta obtener un lecho de 1 ml. Seguidamente se equilibraron las columnas con agua destilada hasta alcanzar un pH neutro, aplicándose entonces las muestras. Los distintos Ins-Ps fueron eluidos con los siguientes sistemas:

- 1.- 15 ml de agua destilada
- 2.- 9 ml de tetraborato sódico 5 mM/ácido fórmico 0.1 M
- 3.- 9 ml de formiato amónico 0.2 M/ác. fórmico 0.1 M
- 4.- 9 ml de formiato amónico 0.4 M/ác. fórmico 0.1 M
- 5.- 9 ml de formiato amónico 0.8 M/ác. fórmico 0.1 M
- 6.- 9 ml de formiato amónico 1 M/ác. fórmico 0.1 M

El empleo de estos sistemas de elución en el orden descrito, proporcionaba la separación de los siguientes compuestos:

- 1.- ^3H -Ins libre
- 2.- GroInsP
- 3.- Ins-P
- 4.- Ins-P₂
- 5.- Ins-P₃
- 6.- Ins-P₄

Tras la aplicación de cada sistema de elución, se fueron recogiendo las fracciones eluidas en volúmenes de 1 ml en viales que se rellenaron con 10 ml de cóctel de centelleo, determinándose seguidamente la radiactividad presente en cada fracción.

Para eluir los Ins-Ps totales, se siguió el citado orden de elución hasta el sistema 2., aplicándose a continuación 10 ml de formiato amónico 1.2 M/ác. fórmico 0.1 M.

Para separar los distintos Ins-Ps, pero eluyendo conjuntamente el Ins-P₃ y el Ins-P₄, se siguió el mismo orden de elución hasta el sistema 4., pasándose seguidamente 10 ml de formiato amónico 1.2 M/ác. fórmico 0.1 M.

2.11.- Determinación de la radiactividad

2.11.1.- Muestras líquidas

Se tomaron alícuotas de 50 ó 100 μ l de las muestras y se depositaron en viales de polipropileno que seguidamente se rellenaron con 10 ml de cóctel de centelleo "Beckman Ready Safe".

2.11.2.- Muestras sólidas

Para determinar la radiactividad presente en los distintos lípidos separados por TLC, se rasparon las manchas lipídicas de las placas de TLC, recogiendo la Silica Gel en viales a los que se añadió 1 ml de metanol, rellenándose con 10 ml de cóctel "Beckman Ready Safe" al cabo de 1 hora.

La radiactividad de las muestras se determinó en ambos casos en un contador de centelleo líquido, con una eficacia aproximada del 80 % para el ^{14}C y del 30% para el ^3H .

Para la valoración final de los resultados, se tuvo siempre en cuenta que la radiactividad presente en los distintos extractos lipídicos, así como la cantidad total de lípidos aplicados en las placas de TLC, podían no ser idénticas para todas las muestras de un mismo experimento, por lo que resultó necesario normalizar las dpms brutas obtenidas del raspado de las manchas lipídicas.

Para ello, se aplicó en todos los casos la fórmula que se cita a continuación, basada en la propuesta por Dixon y col. (430):

Normalización dpms:

$$\text{dpms normalizadas} = \text{dpms de la mancha} \times \frac{\text{Media de las dpms totales de todas las muestras}}{\text{dpms totales de la muestra}}$$

Los resultados de los todos los experimentos referentes a lípidos separados por TLC se expresan siempre en dpms normalizadas.

2.12.- Procesamiento de muestras para Microscopía Electrónica

Una vez estimuladas, las plaquetas fueron prefijadas mediante la adición de 1 vol de glutaraldehído al 2.5 % (p/v) en tampón-cacodilato (cacodilato sódico 0.1 M, ácido clorhídrico 0.1 N, agua bidestilada, 10/0.83/20 v/v/v), permaneciendo durante 2 horas a 4°C en esta solución. A continuación, se centrifugaron a 1000xg durante 15 min, resuspendiéndose el precipitado en un volumen abundante de tampón-cacodilato. Después de realizar dos lavados con tampón-cacodilato, se añadió como fijador tetróxido de osmio al 1% durante 1 hora.

Al cabo de ese tiempo, se realizaron 2 lavados en tampón cacodilato, para seguidamente realizar una serie completa de deshidratación de las muestras con alcoholes etílicos de gradación creciente (30°, 50°, 70°, 80°, 96°).

Una vez deshidratadas y lavadas con óxido de propileno, se procedió a la inclusión de las muestras en resina Epon-Araldita. Seguidamente se obtuvieron cortes semifinos de 1-2 μm para finalmente realizar cortes de un espesor aproximado de 40-60 nm con un ultramicrotomo "Ultratome III" (LKB). Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Jeol-100B.

2.13.- Curvas de agregación

Las medidas de la agregación plaquetaria se realizaron en un agregómetro "Whole Blood Lumi-Aggregometer" Chrono-Log Model-500 (Chrono-Log Corp. USA), que determina la agregación en muestras de sangre completa en base a los cambios en la impedancia eléctrica originados por la agregación de las plaquetas tras la adición de los agonistas (431,432). La corriente eléctrica a través de la muestra fue siempre de 15 kHz, 0.08 mW. La ventaja que ofrece éste método sobre los agregómetros ópticos clásicos (que miden la agregación plaquetaria por los incrementos de la transmitancia a través de una suspensión de plaquetas), consiste en que permite determinar la agregación plaquetaria en sangre completa sin necesidad de aislar previamente las plaquetas, con el consiguiente ahorro de tiempo y de volumen de muestra (433).

Una vez extraída la sangre, se depositaron 0.5 ml en una cubeta siliconizada a la que se añadió un volumen igual de solución salina fisiológica. La muestra se mantuvo a 37°C en agitación durante 5 min antes de realizar la estimulación, durante los cuales se ajustó a cero la impedancia medida en un registrador de doble canal Chrono-Log Model-703; después de añadir el agonista, se midieron los cambios de la impedancia de la muestra durante 2 min.

En otras ocasiones, para determinar si las plaquetas presentaban una funcionalidad normal tras las incubaciones con los distintos isótopos, las medidas de la agregación plaquetaria se realizaron sobre PRP en el "Whole-Blood Lumi Aggregometer" . En estos casos, las estimulaciones también se llevaron a cabo durante 2 min a 37°C en agitación, pero sobre un volumen de PRP de 1 ml.

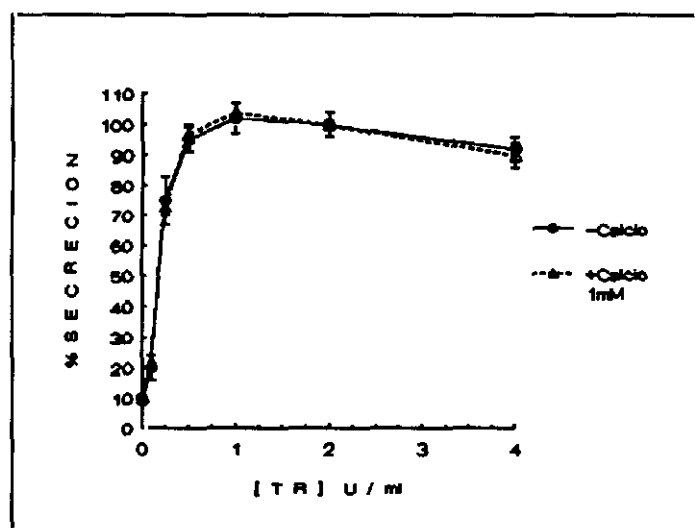
RESULTADOS

1. SECRECION PLAQUETARIA INDUCIDA POR AGONISTAS FISIOLÓGICOS Y AFISIOLÓGICOS

En todos los experimentos de secreción, las plaquetas aisladas en tampón tris-citrato-bicarbonato (modificado por la adición de BSA al 0.1%) y marcadas con ^3H -5-HT, fueron estimuladas mediante la adición de distintos agonistas en ausencia o en presencia de calcio extracelular, cuantificándose la liberación de serotonina de acuerdo al procedimiento descrito en Materiales y Métodos.

1.1. Efecto de la trombina sobre la secreción plaquetaria

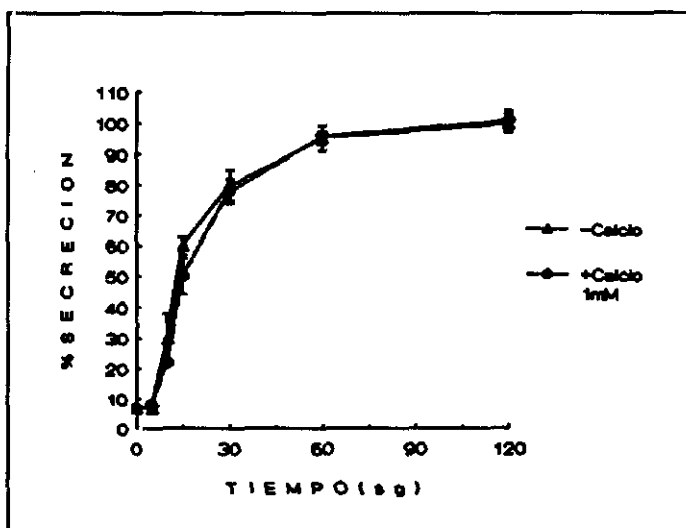
Los resultados obtenidos indican claramente que la trombina induce la secreción de serotonina en plaquetas caninas de forma dependiente de la dosis hasta la concentración de 1 U/ml (concentración a la que se alcanza el máximo de secreción), manteniéndose constantes los niveles de secreción con concentraciones superiores de este agonista (Graf.1).



Graf.1. EFECTO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE TROMBINA SOBRE LA SECRECIÓN PLAQUETARIA DE SEROTONINA (Todas las reacciones frenadas a los 2 min post-estimulación. Media \pm SD de un mínimo de 5 experimentos realizados en ausencia ó en presencia de calcio 1mM. El 100% de secreción corresponde a la inducida por 2U/ml de trombina a los 2 min post-estimulación)

La secreción comienza a ser detectable al cabo de 5-10 sg tras la adición de la trombina (2U/ml), alcanzándose los valores máximos a los 2 min de la estimulación y manteniéndose al mismo nivel a tiempos más largos (Graf.2).

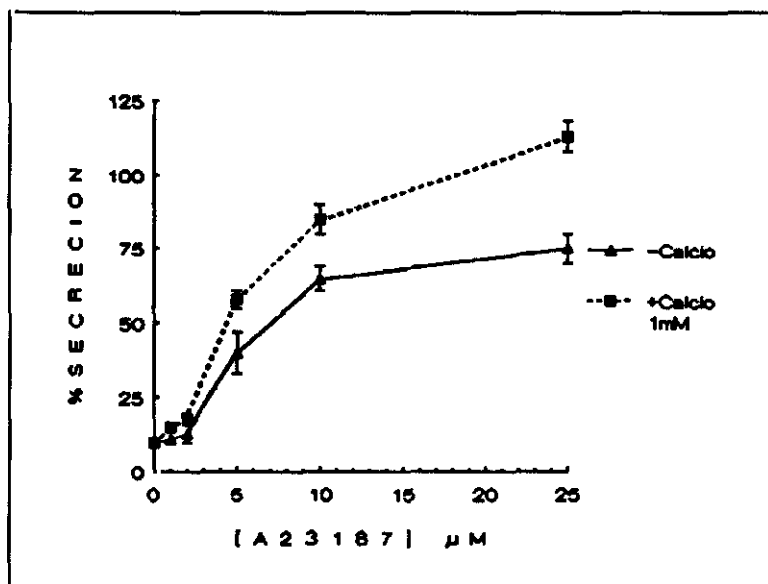
Graf.2. EFECTO DE LA TROMBINA (2U/ml) SOBRE LA SECRECIÓN PLAQUETARIA DE SEROTONINA (Media \pm SD de un mínimo de 5 experimentos realizados en ausencia ó en presencia de calcio 1mM. El 100% de secreción corresponde a la inducida por 2U/ml de trombina a los 2 min post-estimulación)



1.2. Efecto del ionóforo cálcico A23187 sobre la secreción plaquetaria

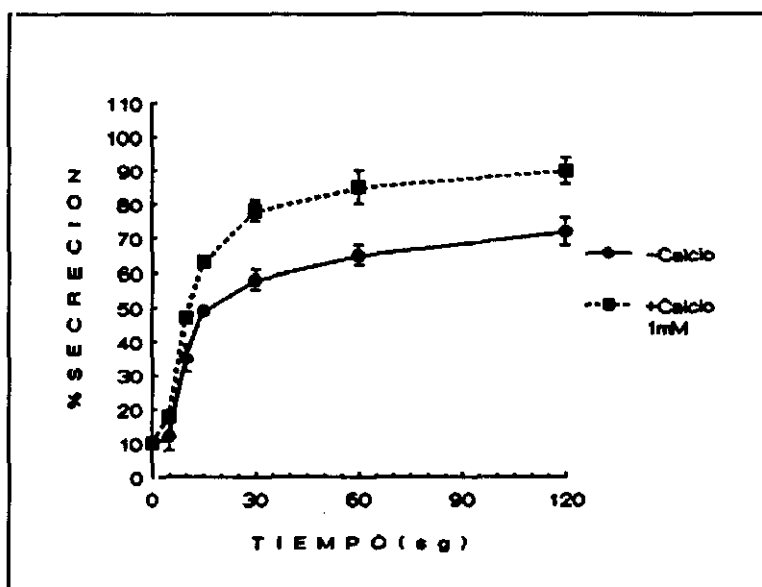
La secreción plaquetaria en respuesta al ionóforo A23187 se produce de manera dosis-dependiente con todas las concentraciones de A23187 utilizadas.

Los niveles de secreción inducidos por este agonista (en ausencia de calcio extracelular) son siempre inferiores (75%) a los estimulados por la trombina (100%), incluso con concentraciones elevadas de ionóforo (25 μ M) (Graf.3).



Graf.3. EFECTO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE IONOPORO A23187 SOBRE LA SECRECION PLAQUETARIA DE SEROTONINA (Todas las reacciones frenadas a los 2 min post-estimulación. Media \pm SD de un mínimo de 5 experimentos realizados en ausencia ó en presencia de calcio 1mM. El 100% de secreción corresponde a la inducida por 2U/ml de trombina a los 2 min post-estimulación)

La cinética de la reacción de secreción inducida por el A23187 (10 μ M), es prácticamente idéntica a la producida en respuesta a la trombina (2U/ml); la liberación de serotonina comienza al cabo de 5-10sg del contacto con el agonista, alcanzándose el 100% de secreción a los 2 min (Graf.4).



Graf.4.EFECTO DEL IONOPORO CALCICO A23187 (10 μ M) SOBRE LA SECRECION PLAQUETARIA DE SEROTONINA (Media \pm SD de un mínimo de 5 experimentos realizados en ausencia ó en presencia de calcio 1mM. El 100% de secreción corresponde a la inducida por 2U/ml de trombina a los 2 min post-estimulación)

1.3. Efecto del calcio extracelular sobre la secreción plaquetaria

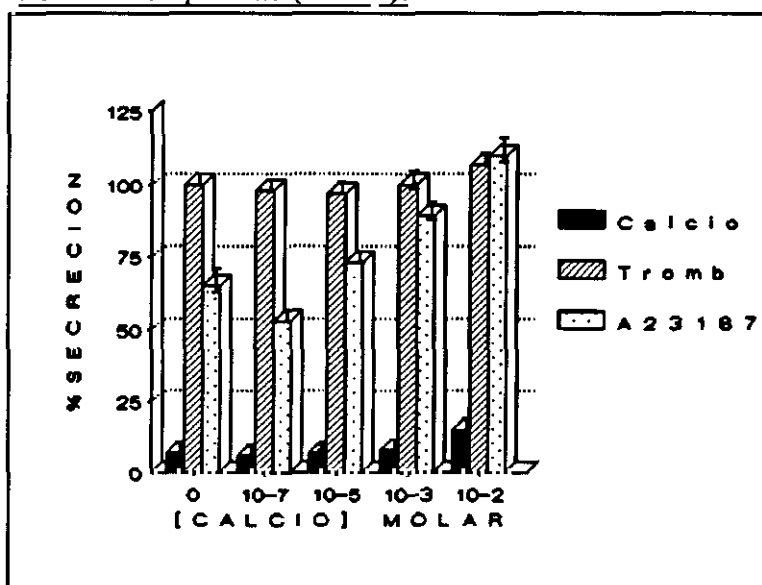
1.3.1. Secreción inducida por calcio

La adición de calcio al medio de incubación no indujo la secreción plaquetaria de serotonina hasta que no se alcanzaron concentraciones de 10^{-2} M (concentraciones completamente afisiológicas), que estimularon la secreción en un 15% (Graf.5).

1.3.2. Efecto del calcio sobre la secreción inducida por trombina

La liberación de serotonina inducida por trombina es independiente del calcio extracelular, ya que no existen diferencias significativas entre los niveles de secreción alcanzados en ausencia de calcio y los producidos en presencia de este catión (1mM) con ninguna de las concentraciones de trombina empleadas (Graf.1).

Por otra parte, la secreción inducida por trombina (2U/ml) no se vió afectada por la adición de distintas concentraciones de calcio al medio extracelular, ni siquiera con concentraciones de calcio que por sí mismas estimulan la secreción (10^{-2} M) (Graf.5)



Graf.5.EFECTO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE CALCIO SOBRE LA SECRECIÓN PLAQUETARIA DE SEROTONINA INDUCIDA POR TROMBINA (2U/ml) Y IONÓFORO A23187 ($10\mu\text{M}$) (Todas las reacciones frenadas a los 2 min post-estimulación. Media \pm SD de un mínimo de 3 experimentos. El 100% de secreción corresponde a la inducida por 2 U/ml de trombina)

1.3.3. Efecto del calcio sobre la secreción inducida por ionóforo A23187

La secreción en respuesta a este agonista sí está influenciada por la presencia de calcio: en ausencia de calcio extracelular, la secreción inducida por distintas concentraciones de ionóforo A23187 no llega nunca a alcanzar los niveles estimulados por la trombina (Graf.3). Sin embargo, en presencia de concentraciones extracelulares de calcio de 10^{-3} M, se produce un marcado incremento de la cantidad de serotonina liberada por acción del A23187, llegando a superar a la inducida por la trombina (Graf.3). Si bien este aumento de la secreción en presencia de calcio extracelular se produce con todas las concentraciones de A23187 empleadas, el incremento es mayor cuanto más alta sea la dosis de A23187 utilizada, llegando a ser del 20% para la concentración de $10\mu\text{M}$ y del 30% para la $25\mu\text{M}$.

El efecto potenciador del calcio sobre la secreción inducida por A23187 es dependiente de la dosis, empezando a manifestarse a concentraciones de calcio iguales o superiores a 10^{-5} M (Graf.5).

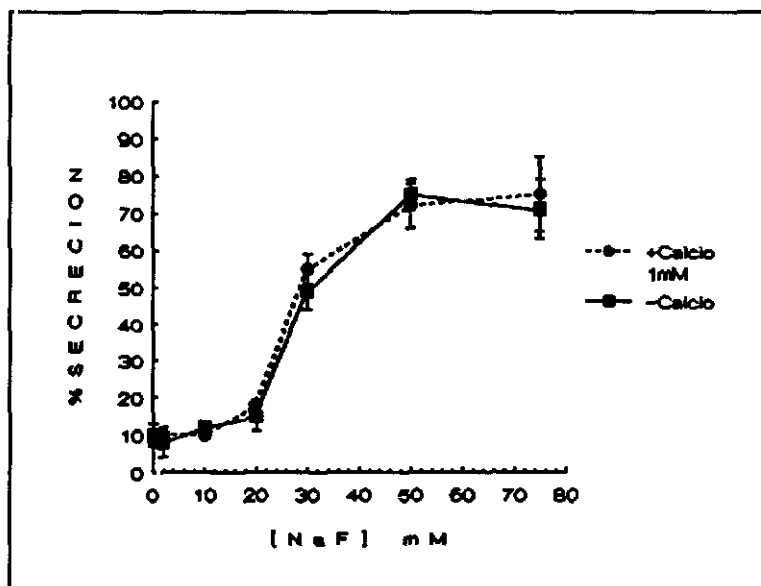
1.4. Efecto de agonistas activadores de proteínas-G-reguladoras sobre la secreción plaquetaria

Con objeto de establecer la posible participación de proteínas-G-reguladoras en los fenómenos de activación de las plaquetas caninas, se realizaron varios experimentos en plaquetas intactas y permeabilizadas con saponina, empleando como estimulantes plaquetarios dos agentes capaces de activar proteínas-G: Fluoruro sódico y análogos no-hidrolizables del GTP (GTP γ S).

1.4.1. Efecto del Fluoruro sódico (NaF) sobre la secreción plaquetaria

El NaF (más probablemente el complejo AlF_4^+), es capaz de unirse a la forma inactiva de las proteínas-G y ocasionar la disociación de sus subunidades mimetizando los efectos de la unión de GTP, originando así la activación de estas proteínas-reguladoras (434,435).

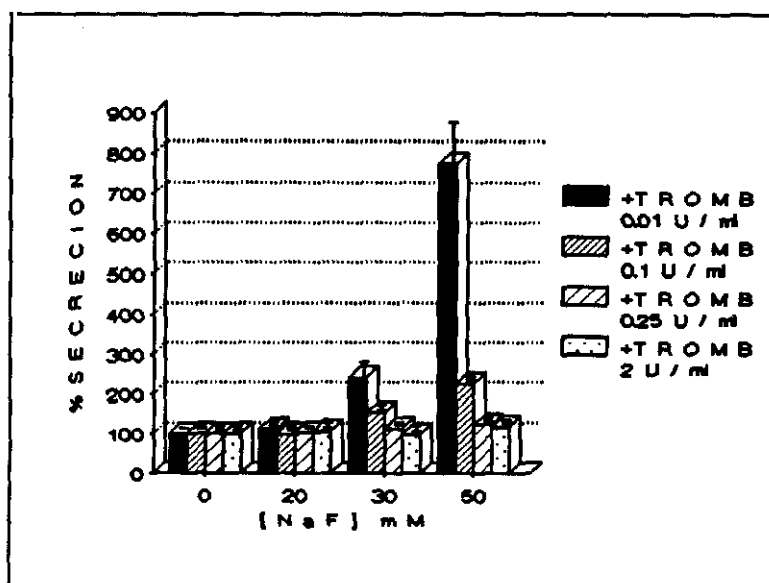
Nuestros resultados demuestran que concentraciones de NaF superiores a 10 mM inducen la secreción plaquetaria de serotonina en células intactas, de una manera dependiente de la dosis y por un mecanismo independiente del calcio extracelular (Graf.6). La cantidad de serotonina secretada en respuesta al NaF llega a alcanzar el 75% del total de serotonina secretada tras la estimulación con trombina (2U/ml).



Graf.6. EFECTO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE FLUORURO SÓDICO (NaF) SOBRE LA SECRECIÓN PLAQUETARIA DE SEROTONINA (Todas las reacciones frenadas a los 2 min post-estimulación. Media \pm SD de un mínimo de 5 experimentos realizados en ausencia ó en presencia de calcio 1mM. El 100% de secreción corresponde a la inducida por 2U/ml de trombina a los 2 min post-estimulación)

1.4.1.1. Efecto del NaF sobre la secreción inducida por trombina

El NaF posee un marcado efecto potenciador de la secreción inducida por trombina, siendo mayor la potenciación cuanto menor sea la concentración de trombina (Graf.7). El NaF llega a multiplicar por 8 la secreción inducida por 0.01U/ml de trombina (concentración que por sí sola apenas es capaz de estimular la secreción, ver apartado 1.1.). El efecto potenciador del NaF sigue siendo manifiesto con concentraciones de trombina de 0.1U/ml, desapareciendo casi por completo al aumentar la dosis de trombina.



Graf.7.EFECTO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE FLUORURO SODICO SOBRE LA SECRECION PLAQUETARIA DE SEROTONINA INDUCIDA POR DIFERENTES DOSIS DE TROMBINA (Todas las reacciones frenadas a los 2 min post-estimulación. Media \pm SD de 3 experimentos realizados en presencia de calcio 1mM. El 100% de secreción corresponde a la secreción inducida por cada concentración de trombina en ausencia de NaF)

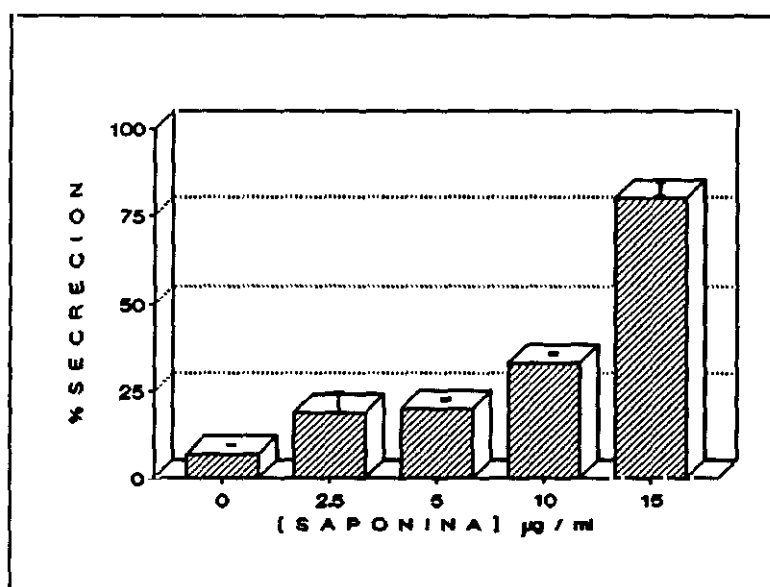
1.4.2. Efecto del GTP γ S sobre la secreción plaquetaria

El GTP γ S es un análogo no-hidrolizable del GTP, por lo que su unión a una proteína-G induce la activación continuada de esta última (436).

En los experimentos con GTP γ S, las plaquetas eran permeabilizadas mediante la adición de saponina 1 min antes de la adición del estímulo.

* Dado que las concentraciones excesivas de saponina pueden producir alteraciones del metabolismo plaquetario que interferirían en los resultados, se realizaron ensayos para

establecer con exactitud la dosis óptima de saponina a emplear en nuestro sistema. Dicha concentración resultó ser de 15 μ g/2 x 10⁸ plaquetas, ya que con esta dosis de saponina se alcanzan los niveles máximos de secreción en respuesta a GTP γ S sin que las plaquetas resulten dañadas durante el proceso de permeabilización (Graf.8).



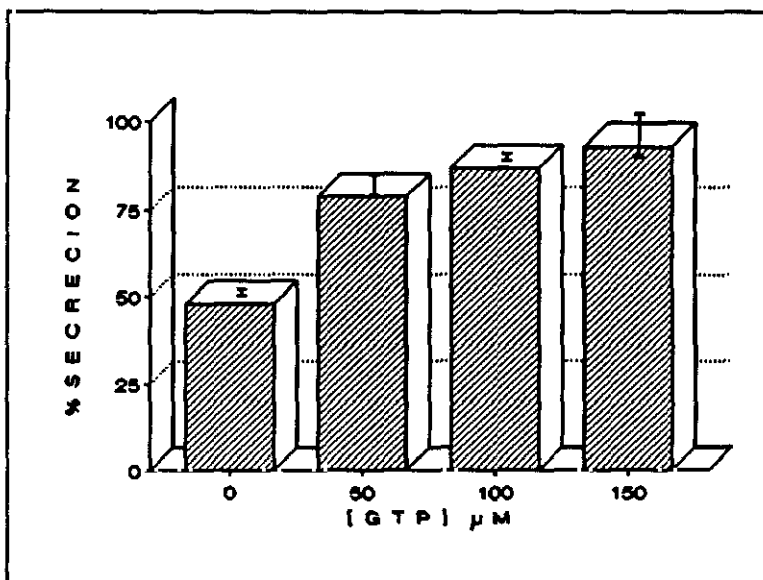
Graf.8.SECRECIÓN DE SEROTONINA INDUCIDA POR GTP γ S (100 μ M) EN PLAQUETAS PERMEABILIZADAS CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE SAPONINA (Todas las reacciones frenadas a los 2 min post-estimulación. Media \pm SD de 3 experimentos realizados en presencia de calcio

0.1 μ M y ATP 0.1mM. El 100% de secreción corresponde a la inducida por 2U/ml de trombina a los 2 min post-estimulación en plaquetas no-permeabilizadas)

El GTP γ S induce la secreción plaquetaria en presencia de ATP (1 mM) y de concentraciones de calcio de 0.1 μ M (equivalentes a las citosólicas en células en reposo) de forma dependiente de la dosis (Graf.9).

La secreción estimulada por el GTP γ S es superior a la inducida por NaF, pero sin llegar nunca a alcanzar los niveles de serotonina liberados en respuesta a trombina.

Graf.9.EFECTO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE GTP γ S SOBRE LA SECRECIÓN DE SEROTONINA EN PLAQUETAS PERMEABILIZADAS (Las plaquetas fueron permeabilizadas mediante la adición de 15 μ g/ml de saponina 1 min antes de la adición del estímulo. Todas las reacciones frenadas a los 2 min post-estimulación. Media \pm SD de 3 experimentos realizados en presencia de calcio 0.1 μ M y ATP 0.1mM. El 100% de secreción corresponde a la inducida por 2U/ml de trombina a los 2 min post-estimulación en plaquetas no-permeabilizadas)

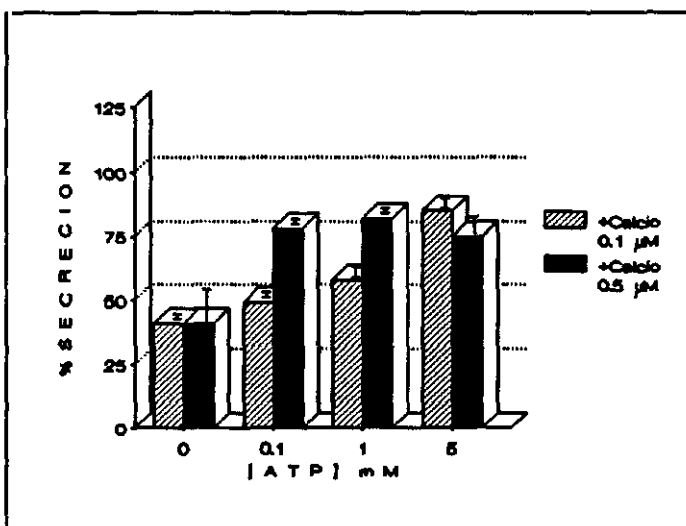


1.5. Efecto del ATP sobre la secreción plaquetaria

El ATP induce numerosas reacciones de fosforilación protéica implicadas en distintas fases de la activación plaquetaria.

Los resultados obtenidos demuestran que las concentraciones de ATP iguales o superiores a 0.1 mM, son capaces de inducir la secreción en plaquetas permeabilizadas con saponina (Graf.10). El nivel de secreción inducido por el ATP en presencia de concentraciones de calcio equivalentes a las existentes en plaquetas activadas (0.5 μ M), es superior al producido con concentraciones equivalentes a las citosólicas de plaquetas en reposo (0.1 μ M), llegando en el primer caso a alcanzar los niveles de secreción estimulados por el ionóforo A23187 (10 μ M).

Graf.10.EFECTO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE ATP SOBRE LA SECRECIÓN DE SEROTONINA EN PLAQUETAS PERMEABILIZADAS (Las plaquetas fueron permeabilizadas mediante la adición de 15 μ g/ml de saponina 1 min antes de la adición del estímulo. Todas las reacciones frenadas a los 2 min post-estimulación. Media \pm SD de 3 experimentos realizados en presencia de calcio 0.1 μ M ó calcio 0.5 μ M. El 100% de secreción corresponde a la inducida por 2U/ml de trombina a los 2 min post-estimulación en plaquetas no-permeabilizadas)



1.6. Efecto del 1,2-Oloacetilglicerol (OAG) sobre la secreción plaquetaria

Con el fin de determinar la posible implicación de la Proteína-Quinasa-C en los procesos secretores en plaquetas de perro, se realizaron experimentos de secreción utilizando un diglicérido exógeno (OAG) como agonista. El OAG es un diglicérido con configuración 1,2- de cadena corta, lo cual le permite atravesar la membrana plasmática celular (315,437).

Nuestros resultados demuestran que las concentraciones de OAG de 20 μ M estimulan la secreción plaquetaria, llegando a duplicar los niveles basales de secreción (Tabla.1).

Por otra parte, el efecto del OAG (20 μ M) sobre la secreción inducida por trombina (2U/ml) es variable en función del tiempo transcurrido entre la adición de ambos agonistas: cuando el OAG y la trombina se añaden al mismo tiempo, se observa un efecto potenciador del OAG sobre la secreción estimulada por la trombina. Por el contrario, si la trombina se añade después de haber preincubado durante 30 sg con el OAG, el efecto de este último es inhibitorio (Tabla.1).

TABLA.1. EFECTO DEL 1,2-OLOACETILGLICEROL SOBRE LA SECRECIÓN DE SEROTONINA (Media \pm SD de un mínimo de 3 Experimentos)

% SECRECIÓN

Control-Basal -----	10% \pm 2
+ Trombina (2U/ml) -----	100% \pm 1
+ OAG (20 μ M) -----	20% \pm 2
+ OAG (20 μ M) + Trombina (2U/ml)----	122% \pm 1
(añadidos al tiempo)	
+ OAG (20 μ M) + Trombina (2U/ml)-----	89% \pm 2
(30sg preincubación con OAG)	

2. EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE DISTINTAS RUTAS METABOLICAS CELULARES SOBRE LA SECRECIÓN PLAQUETARIA

Con objeto de establecer el grado de participación de diversos sistemas metabólicos intracelulares en el proceso de secreción plaquetaria, realizamos algunos experimentos utilizando conocidos inhibidores de ciertas rutas de activación celular, cuyos resultados se describen a continuación.

2.1. Efecto de la Neomicina sobre la secreción plaquetaria inducida por distintos agonistas

La neomicina *inhibe de manera relativamente específica la hidrólisis de polifosfoinosítidos* por unirse a estos fosfolípidos, impidiendo así su ataque por la fosfoinositidasa (438,439,440).

Las reacciones descritas a continuación se llevaron a cabo con plaquetas intactas y en presencia de calcio 1mM, excepto en el caso de las estimulaciones con GTP γ S que se realizaron con plaquetas previamente permeabilizadas por saponina y en presencia de concentraciones de calcio de 0.1 μ M.

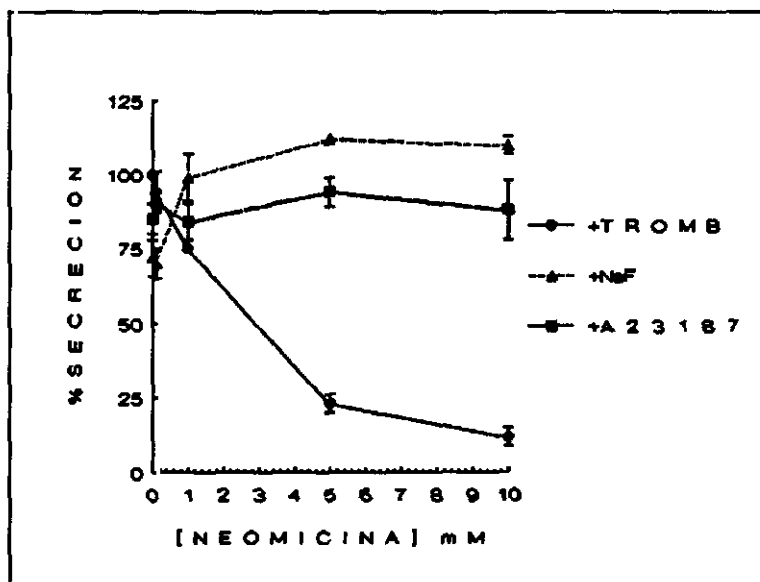
La preincubación con la neomicina tuvo en todos los casos una duración de 2 min.

2.1.1. Secreción inducida por trombina

La neomicina inhibe la secreción inducida por trombina (2U/ml) de forma dependiente de la dosis, a partir de concentraciones superiores a 0.1 mM.

La concentración de 5 mM produce una inhibición de aproximadamente un 75%, que llegará a ser del 100% con concentraciones de neomicina de 10 mM (Graf.11a).

Graf.11a.EFECTO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE NEOMICINA SOBRE LA SECRECIÓN PLAQUETARIA DE SEROTONINA INDUCIDA POR TROMBINA (2U/ml), IONÓFORO A23187 (10 μ M) O FLUORURO SÓDICO (30mM) (Todas las reacciones frenadas a los 2 min post-estimulación. Las preincubaciones con neomicina fueron siempre de 2 min. Media \pm SD de 5 experimentos realizados en presencia de calcio 1 mM . El 100% de secreción corresponde a la inducida por 2U/ml de trombina a los 2 min post-estimulación)



2.1.2. Secreción inducida por ionóforo cálcico A23187

Ninguna de las concentraciones de neomicina empleadas tiene efecto alguno sobre la secreción de serotonina inducida por ionóforo A23187 (10 μ M) (Graf.11a).

2.1.3. Secreción inducida por Fluoruro sódico (NaF)

La neomicina ejerce un marcado efecto estimulante sobre la secreción plaquetaria inducida por NaF (30 mM). Este efecto potenciador es dosis-dependiente, siendo detectable a concentraciones de neomicina iguales o superiores a 1 mM; esta concentración aumenta ya en un 40% la secreción en respuesta al NaF, incremento que llegará a ser de más del 50% con concentraciones superiores (Graf.11a).

2.1.4. Secreción inducida por GTP γ S

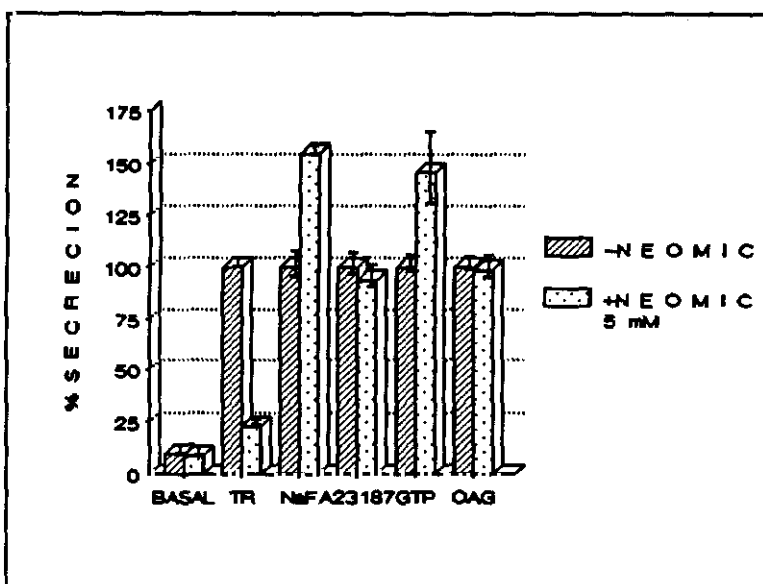
Al igual que sucede con la secreción inducida por NaF, la neomicina potencia significativamente la secreción plaquetaria estimulada por el GTP γ S. Las concentraciones

efectivas de neomicina en este caso son iguales a las descritas para el NaF, siendo también el grado de estimulación alcanzado muy similar para estos dos agonistas (incrementos de la secreción en torno al 50%) (Graf.11b).

Graf.11b.EFECTO DE LA NEOMICINA SOBRE LA SECRECIÓN PLAQUETARIA DE SEROTONINA INDUCIDA POR DIVERSOS AGONISTAS:

TROMBINA (2U/ml), IONÓFORO A23187 (10 μ M), FLUORURO SÓDICO (30mM), GTP γ S (100 μ M), OLOACETILGLICEROL (20 μ M). (Todas las reacciones frenadas a los 2 min post-estimulación. Las preincubaciones con neomicina (5mM) fueron siempre de 2 min. Media \pm SD de un mínimo de 3 experimentos.

Las estimulaciones con Trombina, ionóforo A23187, NaF y OAG fueron realizadas en plaquetas intactas y en presencia de calcio 1mM. Las estimulaciones con GTP γ S fueron realizadas en plaquetas permeabilizadas con saponina (15 μ g/ml) y en presencia de calcio 0.1 μ M y ATP 0.1mM. El 100% de secreción corresponde en cada caso a la máxima inducida por cada agonista en ausencia de neomicina)



2.1.5. Secreción inducida por 1,2-Oloacetilglicerol (OAG)

La adición de neomicina (rango de concentraciones de 0.1 mM a 10 mM) no afecta en modo alguno a la secreción inducida por el OAG (20 μ M) (Graf.11b).

2.2. Efecto de la Quinacrina sobre la secreción plaquetaria inducida por distintos agonistas

La quinacrina actúa como *inhibidor de la actividad fosfolipasa-A₂* en diversos tipos celulares por un mecanismo no bien conocido (441,442).

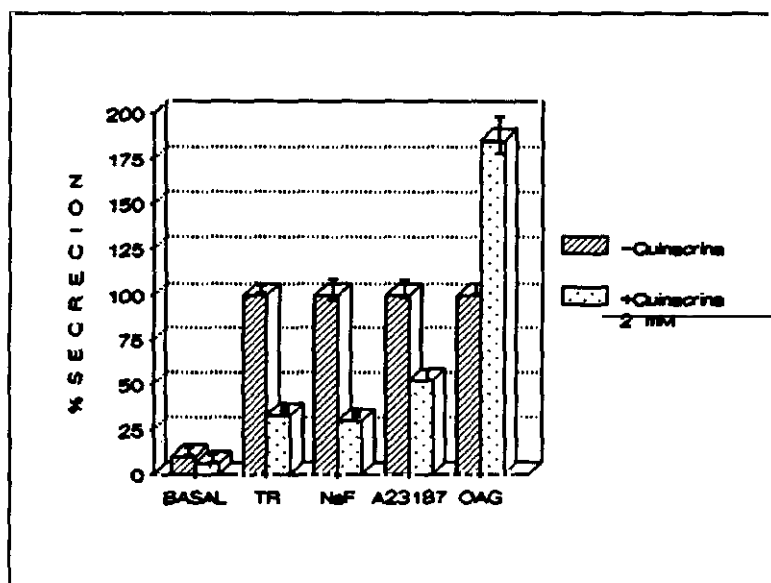
Todas las estimulaciones realizadas en presencia de este inhibidor se efectuaron con plaquetas intactas en presencia de calcio (1 mM), siendo las preincubaciones con la quinacrina de 2 min.

2.2.1. Secreción inducida por trombina

La adición de quinacrina (2 mM) al medio extracelular 2 min antes de la estimulación de las plaquetas con trombina (2U/ml), inhibe en casi un 70% la secreción de serotonina inducida por este agonista (Graf.12).

2.2.2. Secreción inducida por ionóforo A23187

La quinacrina (2 mM) posee también un efecto inhibitorio sobre la secreción inducida por ionóforo A23187 (10 μ M), si bien el grado de inhibición es menor que el ejercido sobre la secreción en respuesta a trombina (no llega a superar el 50%) (Graf.12)



Graf.12.EFECTO DE LA QUINACRINA SOBRE LA SECRECION INDUCIDA POR DIVERSOS AGONISTAS: TROMBINA (2U/ml), IONOPORO A23187 (10 μ M), FLUORURO SODICO (30mM) Y OLOACETILGLICEROL (20 μ M). (Todas las reacciones frenadas a los 2 min post-estimulación. Las preincubaciones con quinacrina (2mM) fueron siempre de 2 min. Media \pm SD de un mínimo de 3 experimentos realizados en presencia de calcio 1mM. El 100% de secreción corresponde en cada caso a la máxima inducida por cada agonista en ausencia de quinacrina)

2.2.3. Secreción inducida por Fluoruro sódico

La presencia de quinacrina (2 mM) en el medio de incubación, produce una inhibición del 70% sobre la secreción de serotonina estimulada por el NaF (30 mM), siendo por tanto la secreción inducida por este agonista la más sensible a la acción de la quinacrina (Graf. 12).

2.2.4. Secreción inducida por 1,2-Oloacetilglicerol (OAG)

Al contrario de lo observado para el resto de los agonistas, la quinacrina (2 mM) posee un efecto potenciador sobre la secreción inducida por el OAG (20 μ M), incrementando en aproximadamente un 85% la secreción en respuesta a este agonista (Graf.12).

2.3. Efecto de la Indometacina sobre la secreción plaquetaria inducida por distintos agonistas

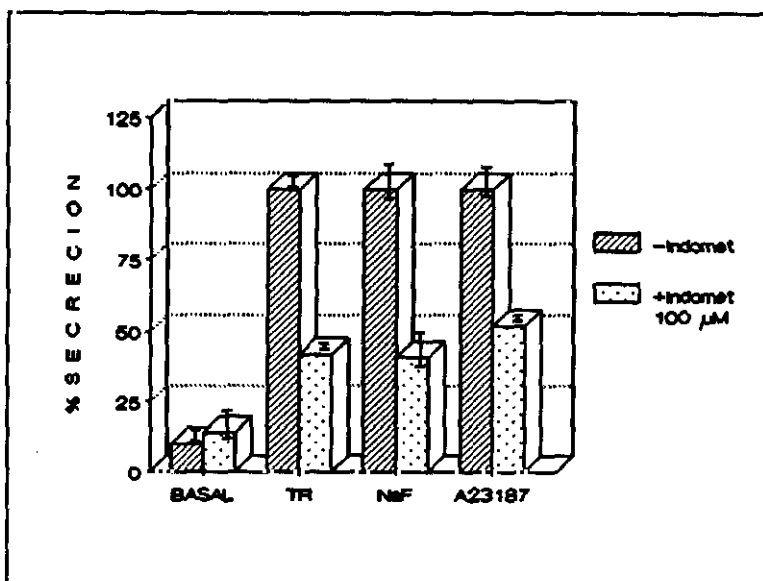
La indometacina es un conocido *inhibidor del metabolismo del ácido araquidónico por la vía ciclooxygenasa*, por bloquear esta actividad enzimática (443).

Todas las reacciones que se describen a continuación se llevaron a cabo en presencia de calcio (1 mM), realizándose preincubaciones de 2 min con indometacina antes de la adición de los distintos agonistas.

2.3.1. Secreción inducida por trombina

La adición de indometacina (100 μ M), ocasiona una inhibición de casi un 60% sobre la secreción plaquetaria inducida por trombina (2U/ml) (Graf.13).

Graf.13.EFECTO DE LA INDOMETACINA SOBRE LA SECRECION INDUCIDA POR DIVERSOS AGONISTAS: TROMBINA (2U/ml), IONOPORO A23187 (10 μ M) Y FLUORURO SODICO (30mM) (Todas las reacciones frenadas a los 2 min post-estimulación. Las preincubaciones con indometacina (100 μ M) fueron siempre de 2 min. Media \pm SD de 3 experimentos realizados en presencia de calcio 1mM. El 100% de secreción corresponde en cada caso a la máxima inducida por cada agonista en ausencia de indometacina)



2.3.2. Secreción inducida por ionóforo A23187

La indometacina (100 μ M) inhibe en aproximadamente un 50% la secreción inducida por ionóforo A23187 (10 μ M); este porcentaje de inhibición es prácticamente idéntico al ocasionado por la quinacrina sobre la secreción estimulada por este mismo agonista (Graf.13).

2.3.3. Secreción inducida por Fluoruro sódico (NaF)

La presencia de indometacina (100 μ M) en el medio de incubación induce una inhibición del 60% sobre la secreción de serotonina activada por el NaF (30mM) (Graf.13).

3. METABOLISMO DE POLIFOSFOINOSITIDOS EN PLAQUETAS CANINAS

Con objeto de establecer la posible participación de la hidrólisis de polifosfoinosítidos y de los metabolitos derivados de esta última en los fenómenos de secreción en plaquetas de perro, se realizaron una serie de experimentos para determinar el grado de hidrólisis de polifosfoinosítidos y los niveles de 1,2-Diacilglicerol e Inositol(1,4,5)P₃ generados en plaquetas activadas por trombina.

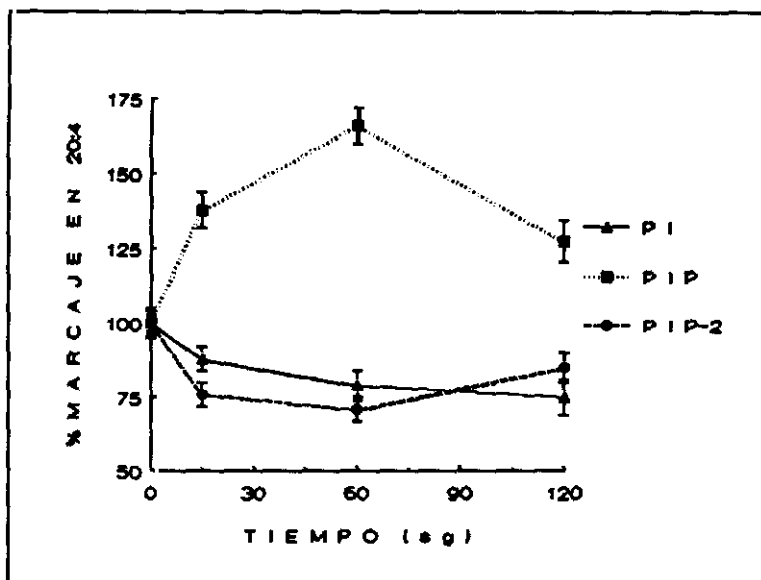
3.1. Hidrólisis de PtdIns(4,5)P₂ y PtdIns(4)P en plaquetas activadas por trombina

Las plaquetas aisladas en tampón Tris-citrato-bicarbonato (conteniendo BSA al 0.1%) y marcadas con ¹⁴C-ácido araquidónico fueron estimuladas con 2U/ml de trombina; las reacciones fueron frenadas a distintos tiempos, extrayéndose y separándose seguidamente los lípidos como se describe en el capítulo de Materiales y Métodos.

El marcaje en $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ experimenta un marcado descenso (25%) 15 sg después de la adición de trombina que se mantendrá durante 45 sg más, restableciéndose los niveles basales al cabo de 2 min (Graf. 14).

De forma paralela a la disminución en $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$, se produce un incremento de marcaje en $\text{PtdIns}(4)\text{P}$, que luego desciende nuevamente hasta recuperar prácticamente los niveles basales transcurridos 2 min tras el contacto con el agonista.

Graf. 14. EFECTO DE LA TROMBINA SOBRE EL METABOLISMO PLAQUETARIO DE FOSFOINOSÍTIDOS (Todas las estimuciones se realizaron con 2U/ml de trombina en presencia de calcio 1mM. Media \pm SD de 3 experimentos. El 100% de marcaje corresponde al contenido en plaquetas no-estimuladas)



3.1.1. Efecto de la quinacrina sobre la hidrólisis de polifosfoinosítidos

La quinacrina se utiliza comunmente como inhibidor de la actividad fosfolipasa- A_2 ; sin embargo, con objeto de estudiar otros posibles efectos este agente sobre las distintas vías de activación plaquetaria, se estudiaron sus acciones sobre la hidrólisis de polifosfoinosítidos.

3.1.1.1. Hidrólisis de polifosfoinosítidos inducida por trombina

La adición de quinacrina (2 mM) al medio de incubación 2 min antes de la estimulación con trombina (2U/ml) inhibe la hidrólisis de polifosfoinosítidos inducida por este agonista, como demuestran los incrementos de los niveles de todos los lípidos de inositol medidos al cabo de 1 min postestimulación (Tabla 2).

3.1.1.2. Hidrólisis de polifosfoinosítidos inducida por ionóforo cálcico A23187

Al igual que en el caso de la trombina, la quinacrina (2 mM) bloquea el ataque de los polifosfoinosítidos por la fosfolipasa-C en respuesta a la estimulación con ionóforo A23187 (10 μ M); el marcaje en fosfoinosítidos al cabo de 1 min tras la adición del A23187 experimenta un considerable aumento en presencia de quinacrina, como aparece reflejado en la tabla 2.

3.1.1.3. Hidrólisis de polifosfoinosítidos inducida por Fluoruro sódico (NaF)

La quinacrina (2 mM) también inhibe la degradación de los polifosfoinosítidos inducida por el NaF(30mM), como indican los resultados expuestos en la tabla 2.

TABLA.2. EFECTO DE LA QUINACRINA SOBRE LA HIDROLISIS DE POLIFOSFOINOSITIDOS INDUCIDA POR DISTINTOS AGONISTAS

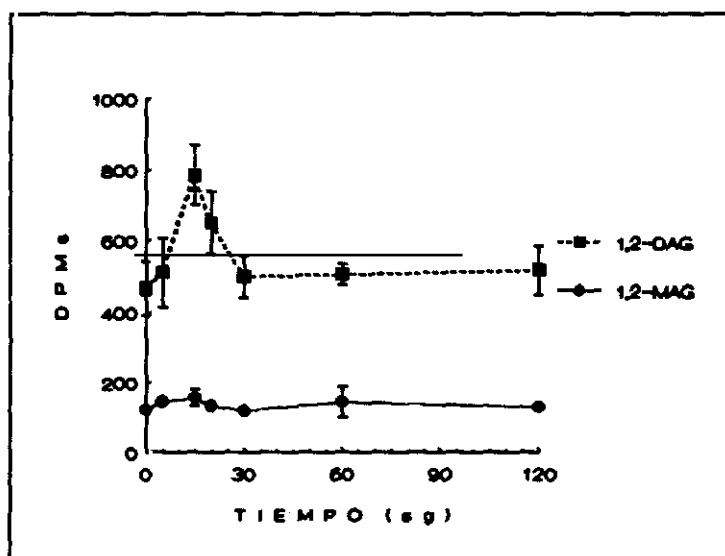
(Todas las reacciones fueron frenadas a los 1 min post-estimulación; Media \pm SD de 3 Experimentos)

	<u>PIP₂ (dpms)</u>	<u>PIP (dpms)</u>	<u>PI (dpms)</u>
BASAL	525 \pm 12	536 \pm 7	7024 \pm 186
" +Quin	642 \pm 45	1427 \pm 11	7394 \pm 206
TROMBINA	389 \pm 19	857 \pm 68	5478 \pm 152
" +Quin	577 \pm 6	1605 \pm 18	6602 \pm 351
A23187	552 \pm 64	758 \pm 12	5408 \pm 223
" +Quin	760 \pm 61	2104 \pm 168	6322 \pm 264
NaF	413 \pm 21	704 \pm 7	5338 \pm 140
" + Quin	801 \pm 83	1623 \pm 99	7164 \pm 382

3.2. Producción de 1,2-Diacilglicerol en plaquetas activadas por trombina

Las plaquetas aisladas y marcadas con ^3H -Glicerol y/o ^3H - ó ^{14}C -ácido araquidónico, fueron estimuladas con trombina en presencia y ausencia de calcio.

La formación de 1,2-DAG en respuesta a la trombina (2U/ml) es transitoria: comienza a ser detectable a los 5 sg tras la adición del agonista y alcanza sus valores máximos a los 15 sg, retornando de nuevo a los niveles basales a los 30 sg (Graf.15). El 1,2-DAG generado en plaquetas activadas por trombina llega a duplicar los niveles basales existentes en plaquetas en reposo.



Graf.15.EFECTO DE LA TROMBINA SOBRE LA FORMACION DE 1,2-DIACILGLICEROL Y 1,2-MONOACILGLICEROL (Todas las estimulaciones se realizaron con 2U/ml de trombina en presencia de calcio 1mM. Media \pm SD de 3 experimentos)

La producción de 1,2-DAG en plaquetas estimuladas con trombina no depende del calcio extracelular, ya que se produce en igual medida tanto en ausencia como en presencia (1mM) de calcio en el medio de incubación.

3.2.1. Producción de 1,2-Monoacilglicerol (1,2-MAG) en plaquetas estimuladas por trombina

Con el fin de determinar una posible actividad enzimática tipo diglicérido-lipasa, se midieron los niveles de 1,2-MAG generados en plaquetas activadas por trombina (2U/ml).

Nuestros resultados indican que el 1,2-MAG plaquetario no experimenta modificaciones durante la estimulación con trombina, manteniéndose niveles idénticos a los basales durante los 5-120 sg posteriores a la adición del agonista (Graf 15).

3.3. Producción de Inositoles-fosfato en plaquetas estimuladas por trombina

Las incubaciones de las plaquetas con ^3H -mio-inositol ($30\mu\text{Ci/ml}$) se realizaron inicialmente en tampón-tris-citrato-bicarbonato (con BSA al 0.1%), durante 180 min.

Después de la incubación, las plaquetas (4×10^8 plaquetas/ml) fueron lavadas y estimuladas con trombina (2U/ml), frenándose las reacciones con ácido tricloroacético y extrayéndose los inositoles-fosfato de acuerdo al procedimiento descrito en Materiales y Métodos.

Antes de comenzar la extracción de inositoles-fosfato, se tomaron alícuotas ($100\mu\text{l}$) de cada muestra para conteo de radiactividad con objeto de determinar el nivel de incorporación del isótopo. El escaso número de dpms medidas en las alícuotas tomadas antes de la extracción (una media de $2100 \text{ dpms}/4 \times 10^8$ plaquetas), así como en las distintas fracciones recogidas tras la elución de las muestras por columnas de intercambio aniónico (máximo $180 \text{ dpms}/4 \times 10^8$ plaquetas en la fracción correspondiente a los Glicerofosfatidilinositoles, o un total de $800-900 \text{ dpms}/4 \times 10^8$ plaquetas cuando se recogían todas las fracciones conjuntamente), puso en evidencia que la capacidad de incorporación de mio-inositol por las plaquetas caninas es muy reducida.

Por otra parte, pudimos comprobar que la radiactividad presente en el sobrenadante resultante de la centrifugación de las plaquetas tras la incubación con ^3H -mio-inositol, era muy elevada en proporción a la contenida en la suspensión de plaquetas lavadas, lo cual confirmaba la escasa incorporación del isótopo por estas células.

Con el fin de incrementar dicha incorporación, se introdujeron diversas modificaciones en los métodos empleados: en primer lugar, se realizaron cambios en la composición del medio de incubación (aumentando o reduciendo el contenido de BSA, eliminando la glucosa del medio durante todo o parte del período de incubación, o utilizando PRP en sustitución de los medios artificiales), modificándose también la duración de los períodos de incubación (que oscilaron entre 60 a 210 min). Asimismo, se emplearon concentraciones superiores de ^3H -mio-inositol (alcanzándose concentraciones de hasta $75\mu\text{Ci/ml}$), aumentándose también de forma paralela el número de plaquetas/ μl hasta concentraciones de $10 \times 10^8/\text{ml}$.

Sin embargo, a pesar de las variaciones introducidas, la incorporación de ^3H -mio-inositol por las plaquetas caninas siguió siendo insuficiente para permitir el estudio de los inositoles-fosfato en estas células.

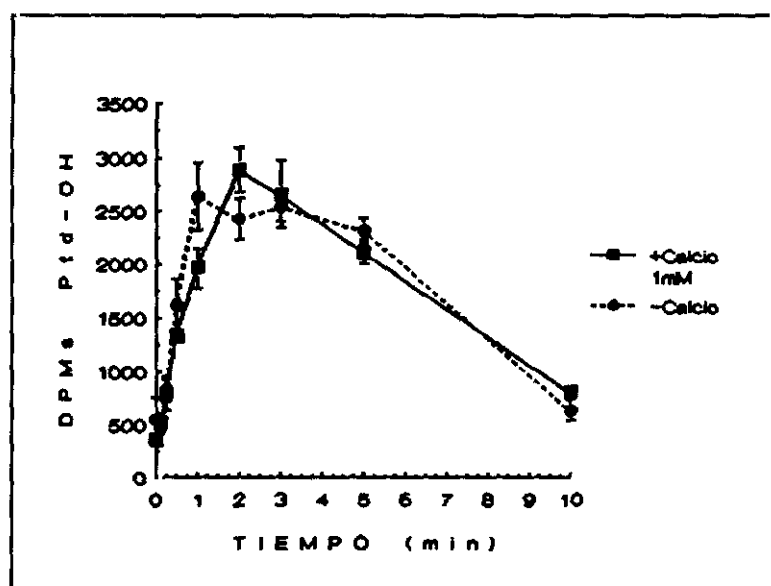
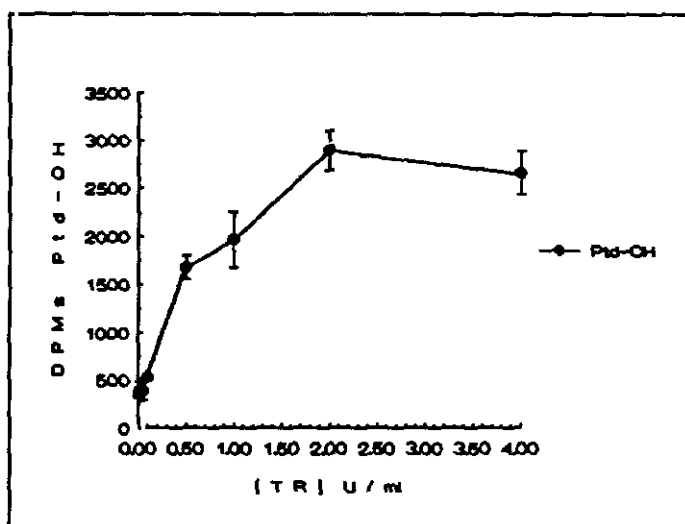
4. PRODUCCION DE ACIDO FOSFATIDICO EN PLAQUETAS ESTIMULADAS POR DISTINTOS AGONISTAS

4.1. Producción de Ptd-OH en plaquetas activadas por trombina

4.1.2. Plaquetas intactas

Los niveles intraplaquetarios de Ptd-OH aumentan significativamente tras la estimulación con concentraciones de trombina iguales o superiores a 0.1 U/ml (Graf.16). El incremento de Ptd-OH en respuesta a la activación por trombina (2U/ml), empieza a ser detectable al cabo de 5-15 sg tras la adición del estímulo, alcanzando los valores máximos (más de ocho veces superiores a los basales) a los 2 min; a tiempos más largos se observa un descenso progresivo, hasta retornar definitivamente al nivel basal de plaquetas en reposo al cabo de 10 min post-estimulación (Graf.17).

Graf.16.EFECTO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE TROMBINA SOBRE LA FORMACION DE ACIDO FOSFATIDICO (Todas las reacciones se realizaron en presencia de calcio 1mM y fueron frenadas a los 2 min post-estimulación. Media \pm SD de 3 Experimentos)



La formación de Ptd-OH inducida por la trombina no está influenciada por la concentración extracelular de calcio, ya que se produce de manera prácticamente idéntica tanto en ausencia como en presencia de calcio (1mM) en el medio de incubación (Graf.17).

Graf.17.EFECTO DEL CALCIO EXTRACELULAR SOBRE LA FORMACION DE ACIDO FOSFATIDICO INDUCIDA POR TROMBINA (Las estimulaciones fueron realizadas con 2U/ml de trombina en ausencia ó en presencia de calcio 1mM. Media \pm SD de 5 experimentos)

4.1.3. Plaquetas permeabilizadas

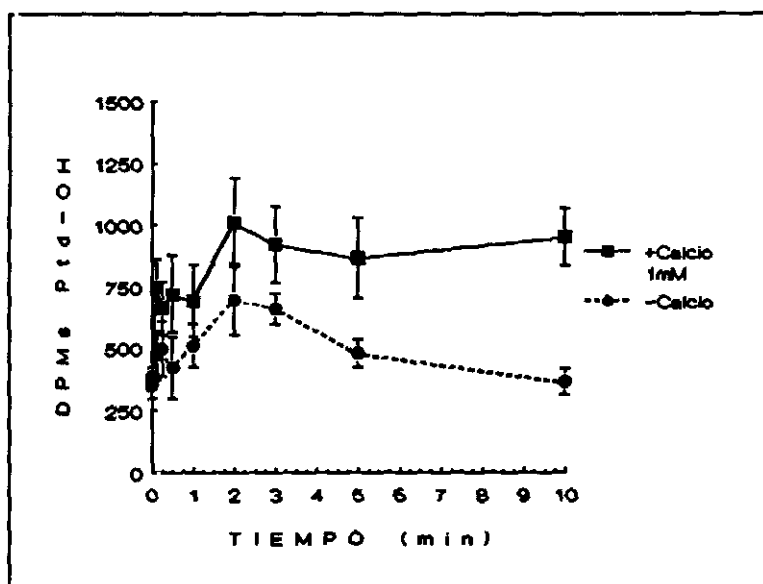
La formación de Ptd-OH inducida por trombina (2U/ml) en plaquetas permeabilizadas con saponina ($15\mu\text{g}/2 \times 10^8$ plaquetas) y en presencia de calcio $0.1\mu\text{M}$, es muy similar a la producida por este mismo agonista en plaquetas intactas (Tabla 3).

4.2. Producción de Ptd-OH en plaquetas activadas por ionóforo A23187

4.2.1. Plaquetas intactas

La estimulación de las plaquetas caninas intactas con ionóforo cálcico A23187 ($10\mu\text{M}$) también induce la formación de Ptd-OH, si bien los niveles de Ptd-OH producidos en respuesta a este agonista son muy inferiores a los generados por la trombina, sin llegar nunca a sobrepasar el triple de los niveles basales (Graf.18). El mecanismo de producción de Ptd-OH activado por el A23187 sí es dependiente del calcio extracelular, disminuyendo drásticamente su formación en ausencia de este catión (Graf.18).

Graf.18.EFECTO DEL IONOFORO A23187 SOBRE LA FORMACION DE ACIDO FOSFATIDICO ((Las estimulaciones fueron realizadas con ionóforo A23187 $10\mu\text{M}$ en ausencia ó en presencia de calcio 1mM . Media \pm SD de 5 experimentos)



4.2.2. Plaquetas permeabilizadas

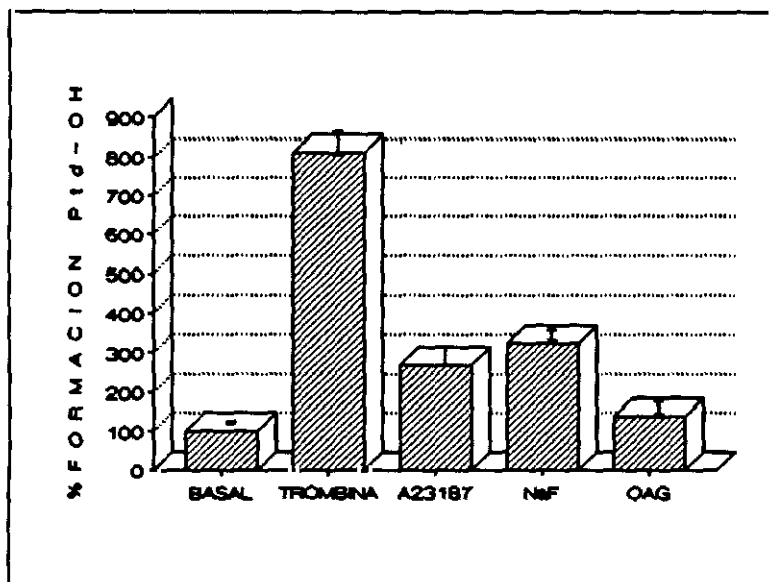
Los niveles de Ptd-OH formados en respuesta al A23187 en plaquetas permeabilizadas con saponina ($15\mu\text{g}/2 \times 10^8$ plaquetas), son muy superiores a los inducidos por este agonista en plaquetas intactas. Las plaquetas permeabilizadas estimuladas por A23187 ($10\mu\text{M}$) en presencia de calcio $0.1\mu\text{M}$, producen niveles de Ptd-OH casi 4 veces superiores a los generados por las plaquetas intactas, llegando incluso a superar a los valores máximos de Ptd-OH formados durante la activación por trombina (2U/ml) (Tabla 3).

TABLA.3. FORMACION DE Ptd-OH INDUCIDA POR TROMBINA O IONOFORO A23187 EN PLAQUETAS INTACTAS Y PERMEABILIZADAS (Media \pm SD de 3 Experimentos)

	PLT.INTACTAS	PLT.PERMEABILIZADAS
BASAL	356 \pm 58 dpms	761 \pm 60 dpms
TROMBINA (2U/ml)	2.890 \pm 198 dpms	3.046 \pm 212 dpms
A23187 (10 μ M)	1.012 \pm 179 dpms	4.268 \pm 399 dpms

4.3. Producción de Ptd-OH en plaquetas activadas por Fluoruro sódico (NaF)

El NaF (30 mM) también induce la síntesis de Ptd-OH en plaquetas, llegando a producirse niveles de Ptd-OH más de tres veces superiores a los basales al cabo de 2 min de la adición de este agonista (Graf.19).



Graf.19. FORMACION DE ACIDO FOSFATIDICO INDUCIDA POR DIVERSOS AGONISTAS: TROMBINA (2U/ml), IONOPORO A23187 (10 μ M), FLUORURO SODICO (30mM) Y OLOACETILGLICEROL (20 μ M). (Todas las reacciones fueron realizadas en presencia de calcio 1mM y frenadas a los 2 min post-estimulación. Media \pm SD de un mínimo de 3 experimentos. El 100% de formación de ácido fosfatídico corresponde al contenido en plaquetas no-estimuladas)

4.4. Producción de Ptd-OH en plaquetas activadas por 1,2-Oloacetilglicerol (OAG)

La estimulación de las plaquetas con OAG (20 μ M) no induce incrementos significativos de los niveles de Ptd-OH, manteniéndose aún los valores basales 2 min después de la estimulación (Graf.19).

4.5. Efecto de la Neomicina sobre la formación de Ptd-OH inducida por distintos agonistas

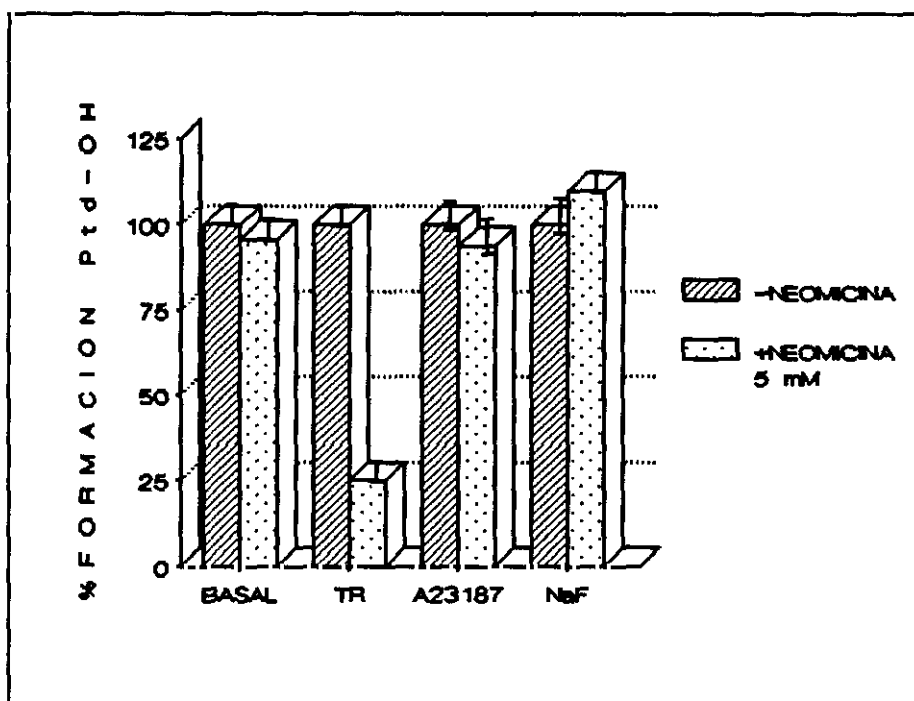
Con objeto de comprobar si el Ptd-OH formado en plaquetas caninas activadas deriva (por acción de una DAG-quinasa) del 1,2-DAG generado por la hidrólisis de polifosfoinosítidos, se realizaron una serie de experimentos en presencia de neomicina (conocido inhibidor del ataque de los polifosfoinosítidos por la fosfolipasa-C) para establecer los posibles efectos de este antibiótico sobre la producción de Ptd-OH en respuesta a diversos agonistas. Las preincubaciones con neomicina fueron siempre de 2 min.

4.5.1. Estimulación con trombina

La adición de neomicina (5 mM) al medio extracelular 2 min antes de la estimulación, produce una drástica inhibición de la formación de Ptd-OH en respuesta a la trombina (2U/ml). La reducción de los niveles de Ptd-OH ocasionada por la neomicina llega a ser del

75% (Graf.20).

Graf.20.EFECTO DE LA NEOMICINA SOBRE LA FORMACION DE ACIDO FOSFATIDICO INDUCIDA POR DIVERSOS AGONISTAS: TROMBINA (2U/ml), IONÓFORO A23187 (10 μ M) Y FLUORURO SÓDICO (30mM) (Todas las reacciones fueron frenadas a los 2 min post-estimulación y realizadas en presencia de calcio 1mM. Las preincubaciones con neomicina (5mM) fueron siempre de 2 min. Media \pm SD de un mínimo de 3 experimentos. El 100% de formación de ácido fosfatídico corresponde al generado en ausencia de neomicina)



4.5.2. Estimulación con ionóforo A23187

La neomicina (5 mM) no afecta a la producción de Ptd-OH en plaquetas estimuladas con A23187 (10 μ M), siendo los niveles de Ptd-OH prácticamente idénticos a los formados en ausencia del inhibidor (Graf.20).

4.5.3. Estimulación con Fluoruro sódico (NaF)

La preincubación de las plaquetas con neomicina (5mM) potencia en aproximadamente un 10% la producción de Ptd-OH en respuesta al NaF (30 mM) (Graf.20).

4.6. Efecto de la Quinacrina sobre la producción de Ptd-OH inducida por distintos agonistas

Con el fin de esclarecer los efectos de la quinacrina sobre la activación plaquetaria, se determinaron los niveles de Ptd-OH generados en plaquetas preincubadas con quinacrina durante 2 min y posteriormente estimuladas con diversos agonistas.

4.6.1. Estimulación con trombina

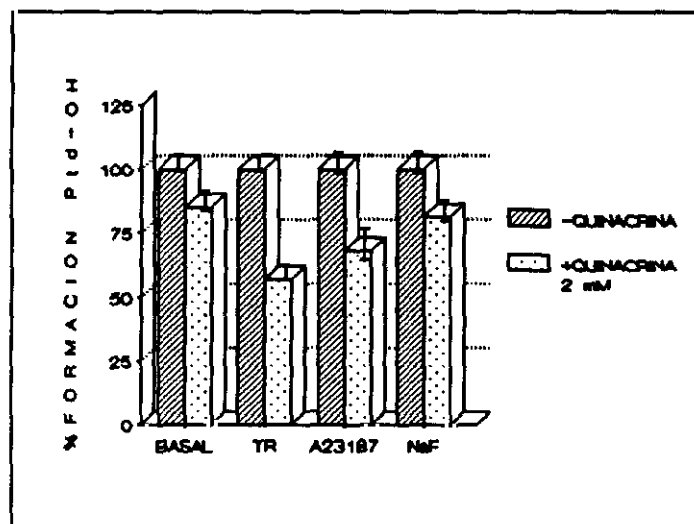
La quinacrina (2 mM) induce una reducción de casi un 50% en los niveles de Ptd-OH producidos en respuesta a trombina (2U/ml) (Graf.21).

4.6.2. Estimulación con ionóforo A23187

El tratamiento de las plaquetas con quinacrina (2mM) inhibe en un 40% la formación de Ptd-OH inducida por el ionóforo A23187 (Graf.21).

4.6.3. Estimulación con Fluoruro sódico (NaF)

La quinacrina (2mM) también posee un efecto inhibitorio sobre la producción de Ptd-OH estimulada por el NaF (30mM), si bien en este caso la inhibición es más discreta (aproximadamente un 20%) que la ejercida sobre el resto de los agonistas empleados (Graf.21).



Graf.21.EFECTO DE LA QUINACRINA SOBRE LA FORMACION DE ACIDO FOSFATIDICO INDUCIDA POR DIVERSOS AGONISTAS: TROMBINA (2U/ml), IONOPORO A23187 (10μM) Y FLUORURO SODICO (30mM) (Todas las reacciones fueron realizadas en presencia de calcio 1mM y frenadas a los 2 min post-estimulación. Las preincubaciones con quinacrina (2mM) fueron siempre de 2 min. Media \pm SD de 3 experimentos. El 100% de formación de ácido fosfatídico corresponde al generado en ausencia de quinacrina

5. FOSFOLIPIDOS DE MEMBRANA PLAQUETARIOS

Con el fin de determinar la posible participación de los principales fosfolípidos de membrana en los fenómenos de activación plaquetaria por actuar como fuente de segundos mensajeros (1,2-DAG) u otros lípidos implicados en distintas rutas de activación (ácido araquidónico y/o Ptd-OH), se realizaron experimentos en plaquetas marcadas con distintos isótopos para medir los cambios producidos en los fosfolípidos tras la estimulación con distintos agonistas.

5.1. Fosfolípidos en plaquetas en reposo

La distribución del marcaje (en dpms/ 4×10^8 plaquetas, media \pm SD de 3 experimentos) entre los principales fosfolípidos en plaquetas no-estimuladas tras la incubación con ^{14}C -20:4 (0.5 $\mu\text{Ci}/4 \times 10^8$ plaquetas) y/o ^3H -Glicerol (3 $\mu\text{Ci}/4 \times 10^8$ plaquetas), es la siguiente (Tabla 4; datos correspondientes a un experimento representativo.):

<u>Marcaje</u>	<u>PC</u>	<u>PE</u>	<u>PS</u>	<u>PI</u>	<u>PA</u>
^{14}C -20:4 (dpms)	108.377 \pm 2.400	53.701 \pm 765	8.447 \pm 475	13.372 \pm 1.112	356 \pm 58
% del total	58.7 \pm 1.3	29 \pm 0.4	4.6 \pm 0.25	7.2 \pm 0.6	0.2 \pm 0.1
^3H -Glicerol (dpms)	66.978 \pm 1.215	37.064 \pm 789	3.736 \pm 172	7.066 \pm 879	298 \pm 14
% del total	58 \pm 1	32 \pm 0.7	3.2 \pm 0.2	6.1 \pm 0.8	0.2 \pm 0.1

5.2. Fosfolípidos en plaquetas estimuladas

Para estudiar el metabolismo de los principales fosfolípidos de membrana durante la activación plaquetaria, se llevaron a cabo una serie de experimentos en plaquetas marcadas con ^3H -Glicerol y ^3H - ó ^{14}C -ácido araquidónico, comparándose los descensos/aumentos de marcaje experimentados por los fosfolípidos en respuesta a diversos agonistas.

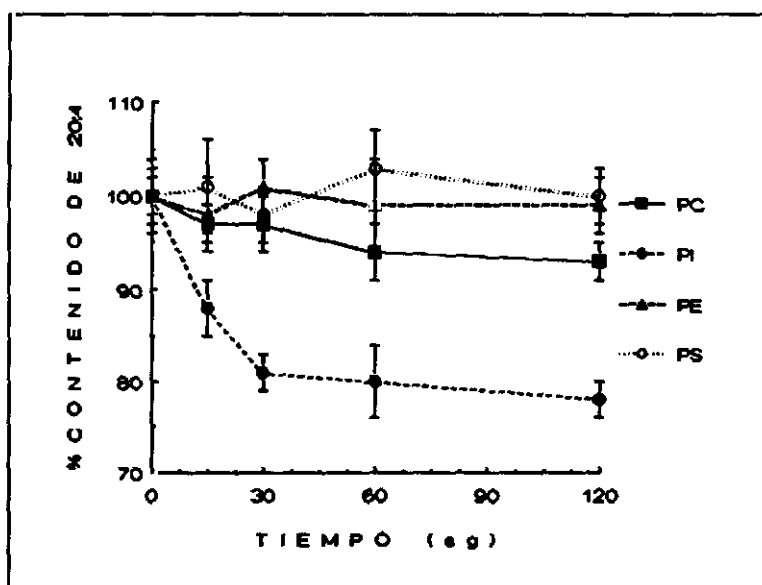
5.2.1. Plaquetas estimuladas por trombina

a) Marcaje en ^{14}C - ó ^3H -20:4

La activación con trombina ocasiona una disminución del marcaje en Fosfatidilinositol (PI) y Fosfatidilcolina (PC), sin modificarse prácticamente el correspondiente a Fosfatidilserina (PS) y Fosfatidiletanolamina (PE) (Graf.22 y Tabla.5).

El fosfolípido que experimenta la mayor pérdida de 20:4 tras la estimulación con trombina, es el PI, el cual manifiesta una reducción significativa del contenido de 20:4 a los 15-30sg post-estimulación, llegando a disminuir el marcaje hasta un 22% al cabo de 2 min.

Graf.22.MOVILIZACIÓN DE 20:4 A PARTIR DE LOS PRINCIPALES FOSFOLÍPIDOS DE MEMBRANA EN PLAQUETAS ESTIMULADAS POR TROMBINA (2U/ml)
(Todas las reacciones se realizaron en presencia de calcio 1mM. Media \pm SD de 3 experimentos. El 100% de contenido en 20:4 corresponde al existente en plaquetas no-estimuladas)

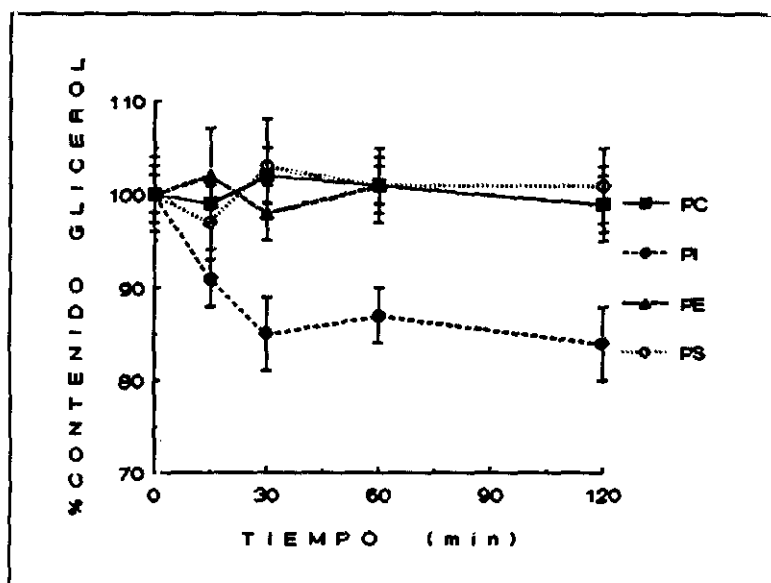


También se observa una reducción considerable del marcaje en PC (hasta un 7%), si bien ésta se produce más tardíamente que la experimentada por el PI, ya que no empieza a ser evidente hasta transcurrido 1 min post-estimulación.

Por el contrario, el contenido de 20:4 en PS y PE permanece prácticamente inalterado tras la activación de las plaquetas con trombina.

b) Marcaje en ^3H -Glicerol

El marcaje en ^3H -glicerol de los principales fosfolípidos de membrana (PC, PS y PE) no manifiesta modificación alguna tras la activación de las plaquetas con trombina (2U/ml), mientras que el correspondiente al PtdIns desciende considerablemente al cabo de 15-30sg de la adición del agonista (Graf.23 y Tabla.5).



Graf. 23. EFECTO DE LA TROMBINA SOBRE EL CONTENIDO EN 3H-GLICEROL DE LOS FOSFOLIPIDOS DE MEMBRANA PLAQUETARIOS (Todas las estimulaciones se realizaron con 2U/ml de trombina en presencia de calcio 1mM. Media \pm SD de 3 experimentos. El 100% de contenido en 3 H-glicerol corresponde al existente en plaquetas no-estimuladas)

5.2.2. Plaquetas estimuladas por ionóforo A23187

a) Marcaje en 14 C- 6 3 H-20:4

La reducción del contenido de 20:4 inducida por el A23187 en los fosfolípidos plaquetarios es cuantitativamente más significativa que la originada por la trombina.

Al cabo de 2 min de la estimulación con A23187, se produce una disminución del 23% del marcaje en PI, del 10% en PC, y del 8% en PE, manteniéndose el marcaje en PS prácticamente idéntico al correspondiente a plaquetas en reposo (Tabla 5).

b) Marcaje en 3 H-Glicerol

El único fosfolípido que no experimenta una reducción significativa del marcaje en 3 H-Glicerol tras la estimulación con ionóforo A23187 (10μ M), es la PS.

El resto de los fosfolípidos estudiados presentan pérdidas de marcaje considerables al cabo de 2 min tras la adición del A23187: PC pierde aproximadamente un 6% de las dpms que contenía antes de la estimulación, PE un 10%, y PI llega a perder hasta un 22% del marcaje inicial (Tabla 5).

5.2.3. Plaquetas estimuladas con NaF

a) Marcaje en 14 C- 6 3 H-20:4

La activación de las plaquetas con NaF (30 mM) solamente produce una disminución del marcaje en PI, que llega a perder hasta un 24% de las dpms que presenta en células en reposo.

Sin embargo, los otros fosfolípidos (PC, PE, y PS) no sufren cambios importantes, aunque cabe destacar un muy ligero aumento del marcaje en PS a los 2 min post-estimulación (Tabla 5).

b) Marcaje en ^3H -Glicerol

Los resultados con plaquetas marcadas con ^3H -Glicerol son perfectamente equivalentes a los obtenidos con ^{14}C - y/o ^3H -20:4. El NaF (30 mM) ocasiona un marcado descenso del marcaje en PI (hasta un 22%), permaneciendo el resto de los fosfolípidos en niveles prácticamente idénticos a los valores basales, observándose si acaso un discreto incremento del marcaje en PS (Tabla 5).

5.3. Efecto de la quinacrina sobre el metabolismo de los fosfolípidos en plaquetas activadas por distintos agonistas

Con objeto de determinar la posible existencia de una actividad tipo fosfolipasa- A_2 en plaquetas caninas, se llevaron a cabo experimentos con plaquetas marcadas con ^{14}C -20:4 y preincubadas durante 2 min con quinacrina (inhibidor de dicha actividad enzimática) antes de su estimulación por diversos agonistas.

5.3.1. Plaquetas estimuladas con trombina

La quinacrina (2 mM) inhibe la pérdida de marcaje en ^{14}C -20:4 experimentada por los principales fosfolípidos de membrana tras la activación con trombina (2U/ml).

En plaquetas tratadas con quinacrina y posteriormente estimuladas con trombina, el marcaje en PC al cabo de 2 min post-estimulación es prácticamente idéntico al que presentan las plaquetas en reposo (mientras que en ausencia de quinacrina dicho marcaje experimentaba un descenso del 6%).

La quinacrina también inhibe la pérdida de ^{14}C -20:4 a partir de PI: en ausencia de quinacrina, la trombina induce una disminución de un 22% del contenido en 20:4 de este fosfolípido, pero en presencia de quinacrina (2 mM) los niveles de 20:4 existentes en PI son casi equivalentes a los medidos en plaquetas no-estimuladas (Tabla 5).

5.3.2. Plaquetas estimuladas con ionóforo A23187

La quinacrina (2mM) induce aumentos del marcaje en PC, PE y PI tras la estimulación con A23187 (10 μM): en ausencia de quinacrina, el A23187 ocasiona pérdidas del 22% del marcaje en 20:4 contenido en PI, mientras que en presencia de quinacrina dicho marcaje sólo disminuye en un 10%. El marcaje en PC y PE en plaquetas tratadas con quinacrina es superior en un 2% y en un 4% respectivamente al medido en ausencia de quinacrina tras la estimulación con A23187 (Tabla 5).

5.3.3. Plaquetas estimuladas con Fluoruro sódico (NaF)

La quinacrina ejerce efectos contrapuestos sobre los fosfolípidos en plaquetas activadas por NaF (30 mM).

La preincubación con quinacrina (2 mM) reduce considerablemente la pérdida de marcaje en 20:4 a partir de PI: en ausencia de quinacrina el marcaje en PI al cabo de 2 min tras la estimulación con NaF es un 24% más bajo que el contenido en plaquetas en reposo, mientras que en presencia de quinacrina dicho marcaje es prácticamente idéntico al valor

basal (Tabla 5).

Por el contrario, la quinacrina posee un efecto totalmente opuesto sobre el 20:4 contenido en PC y PE, ya que sorprendentemente, el marcaje presente en estos dos fosfolípidos tras la activación con NaF, es inferior en presencia de quinacrina que en su ausencia (en ausencia de quinacrina el NaF prácticamente no induce modificaciones en PC ni en PE, mientras que en plaquetas tratadas con este inhibidor se producen reducciones en el marcaje del 11% y del 8% respectivamente) (Tabla 5).

TABLA.5. MARCAJE EN FOSFOLIPIDOS EN PLAQUETAS ESTIMULADAS POR DIVERSOS AGONISTAS Y EFECTO DE LA QUINACRINA SOBRE LA MOVILIZACION DE 20:4 (Todas las reacciones frenadas a los 2 min post-estimulación, Media \pm SD de 5 Experimentos)

	<u>PC</u>	<u>PE</u>	<u>PS</u>	<u>PI</u>
<u>TROMBINA</u>				
^{14}C -20:4 (-Quinacrina)	93% \pm 2	99% \pm 3	100% \pm 3	78% \pm 2
^{14}C -20:4 (+Quinacrina 2mM)	99% \pm 0.5	97% \pm 2	103% \pm 4	94% \pm 5
^3H -Glicerol	99% \pm 3	99% \pm 4	101% \pm 3	84% \pm 4
<u>A23187</u>				
^{14}C -20:4 (-Quinacrina)	90% \pm 1	92% \pm 2	98% \pm 3	77% \pm 3
^{14}C -20:4 (+Quinacrina 2mM)	93% \pm 2	96% \pm 3	101% \pm 3	90% \pm 4
^3H -Glicerol	94% \pm 2	90% \pm 2	99% \pm 3	78% \pm 2
<u>NaF</u>				
^{14}C -20:4 (-Quinacrina)	99% \pm 2	103% \pm 2	105% \pm 3	76% \pm 2
^{14}C -20:4 (+Quinacrina 2mM)	89% \pm 1	92% \pm 2	102% \pm 3	102% \pm 5
^3H -Glicerol	99% \pm 5	101% \pm 2	106% \pm 5	78% \pm 2

(El 100% de marcaje corresponde al valor basal)

5.4. Efecto de la Neomicina sobre el metabolismo de los fosfolípidos en plaquetas activadas por NaF

La presencia de neomicina (5 mM) en el medio de incubación, induce reducciones significativas del marcaje en ^{14}C -20:4 y ^3H -Glicerol contenido en PC tras la estimulación de las plaquetas con NaF (30 mM) (Media \pm SD de 2 Experimentos; el 100% de marcaje corresponde al valor basal):

	<u>NaF</u>	<u>NaF + Neomicina</u>
^{14}C -20:4	99% \pm 2	91% \pm 3
^3H -Glicerol	99% \pm 5	93% \pm 2

6. MOVILIZACION Y METABOLISMO DE ACIDO ARAQUIDONICO

Con el fin de estudiar las vías de liberación de 20:4 y la participación de sus principales metabolitos oxigenados activos en la secreción plaquetaria, se efectuaron distintos experimentos para establecer el grado de movilización y posterior metabolismo de 20:4 en plaquetas activadas por diversos agonistas.

6.1. Movilización de ácido araquidónico (20:4) en plaquetas activadas

Las plaquetas aisladas y marcadas con ^3H - ó ^{14}C -20:4 fueron estimuladas con distintos agonistas durante distintos períodos de tiempo, determinándose finalmente los niveles de 20:4 liberados en respuesta a la activación.

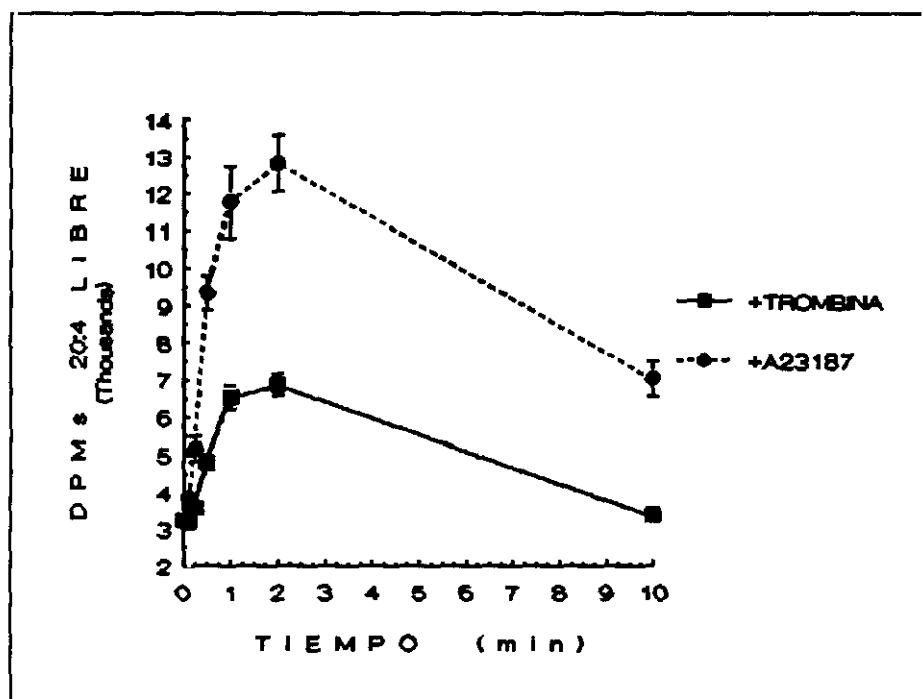
6.1.1. Estimulación con trombina

A los 15 sg tras la adición de la trombina (2U/ml), se observa un ligero incremento de los niveles plaquetarios de 20:4 libre, que sigue aumentando hasta alcanzar los valores máximos (3 veces superiores a los basales) a los 2 min, descendiendo posteriormente para retornar a los niveles basales al cabo de 10 min de la estimulación (Graf.24).

6.1.2. Estimulación con ionóforo cálcico A23187

La liberación de 20:4 inducida por el A23187 es más rápida y marcada que la producida en respuesta a la trombina; al cabo de 15 sg de la estimulación, los niveles de 20:4 libre llegan ya a duplicar a los basales, superando en más de un 30% a los generados por la trombina a ese mismo tiempo.

Los valores máximos de 20:4 liberados por el ionóforo a los 2 min (casi 5 veces



superiores a los basales), llegan a duplicar los correspondientes a la trombina, permaneciendo elevados por encima de los niveles basales incluso al cabo de 10 min tras la adición del estímulo (Graf.24).

Graf.24. LIBERACION DE 20:4 EN PLAQUETAS ESTIMULADAS POR TROMBINA O IONOPORO A23187 (Todas las reacciones se realizaron en presencia de calcio 1mM. Media \pm SD de 5 experimentos)

6.1.3. Estimulación con Fluoruro sódico (NaF)

La activación de las plaquetas con NaF (30mM) induce un aumento de los niveles intracelulares de 20:4 libre, que al cabo de 2 min tras la adición del agonista llegan a superar en un 66% a los valores basales (Tabla 6).

TABLA.6. MOVILIZACION DE 20:4 INDUCIDA POR NaF

(Todas las reacciones frenadas a los 2 min post-estimulación; Media \pm SD de 3 Experimentos)

	20:4 libre (dpms)
BASAL	3.246 \pm 269 (100% \pm 8)
NaF (30mM)	5.388 \pm 551 (166% \pm 17)

6.1.4. Estimulación con Oloacetilglicerol (OAG)

La adición de OAG (20 μ M) al medio de incubación también produce una discreta movilización del 20:4 plaquetario, elevándose los niveles de 20:4 libre un 10% por encima de los valores basales a los 2 min post-estimulación.

6.2. Metabolismo de 20:4 en plaquetas activadas

Para estudiar la participación de los metabolitos oxigenados del 20:4 en los procesos secretorios, se procedió a la determinación de su formación en plaquetas activadas por distintos agonistas.

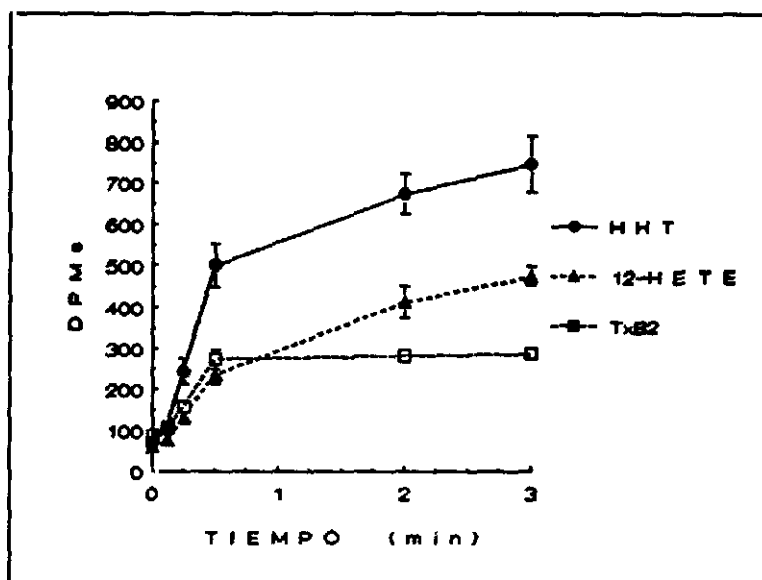
Para ello, las plaquetas marcadas con ^{14}C -20:4 eran estimuladas durante distintos períodos de tiempo, determinándose los niveles de 12-HETE, HHT y TxA_2 generados en respuesta a trombina y ionóforo A23187.

6.2.1. Estimulación con trombina

Las plaquetas caninas responden a la estimulación por trombina (2U/ml) con la formación de cantidades significativas de 12-HETE, HHT y TxA_2 .

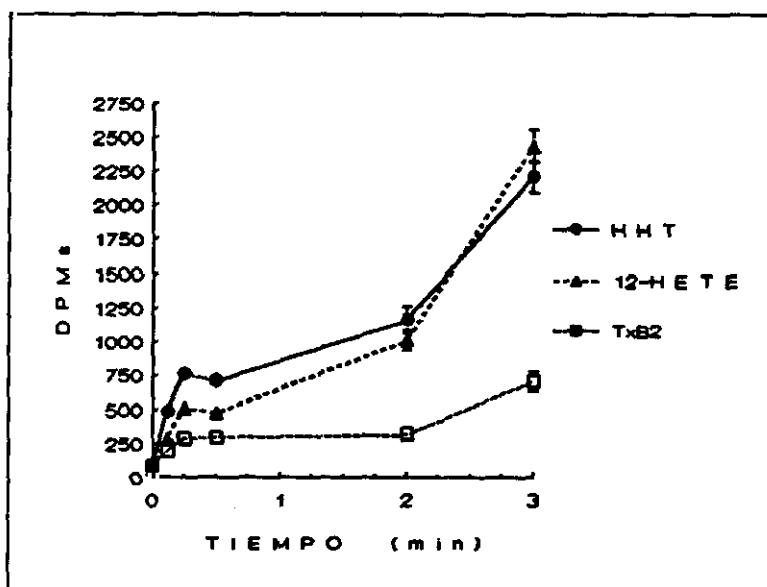
La síntesis de estos compuestos se produce de forma paralela a la liberación de 20:4, siendo el TxA_2 el primer metabolito en alcanzar los valores máximos (a los 30 sg post-estimulación, mientras que el 12-HETE y el HHT lo hacen a partir de los 2 min) (Graf.25).

Graf.25.FORMACION DE METABOLITOS DE 20:4 EN PLAQUETAS ESTIMULADAS POR TROMBINA (Todas las estimulaciones se realizaron con 2U/ml de trombina en presencia de calcio 1mM. Media \pm SD de 3 experimentos)



6.2.2. Estimulación con A23187

La formación de 12-HETE, HHT y TxA_2 en respuesta al ionóforo A23187, tiene lugar de forma ligeramente más lenta que la inducida por la trombina, pero los niveles máximos producidos son muy superiores (más del triple) a los generados por este último agonista, y se mantienen elevados durante más tiempo (Graf.26).



Graf.26.FORMACION DE METABOLITOS DE 20:4 EN PLAQUETAS ESTIMULADAS POR IONOFORO A23187 (Todas las estimulaciones se realizaron con ionóforo A23187 10 μ M en presencia de calcio 1mM. Media \pm SD de 3 experimentos)

6.3. Efecto de la neomicina sobre la liberación de 20:4 inducida por distintos agonistas

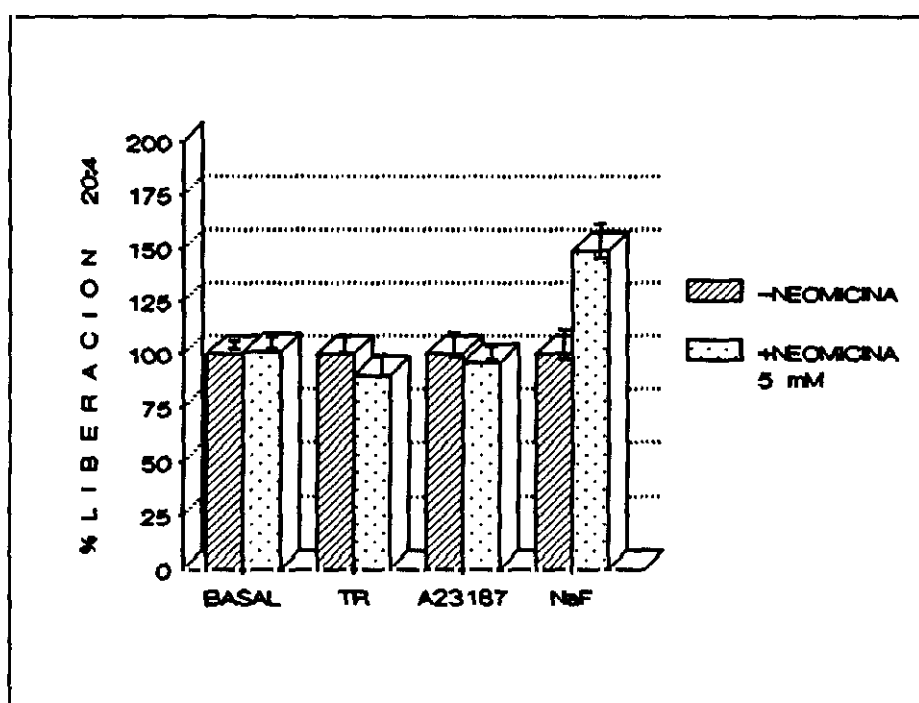
Para establecer posibles relaciones entre las vías de liberación de 20:4 activadas por los distintos estimulantes plaquetarios y la hidrólisis de polifosfoinosítidos inducida por estos mismos agonistas, se realizaron determinaciones de 20:4 en plaquetas tratadas durante 2 min con neomicina.

6.3.1. Plaquetas estimuladas con trombina

Nuestros resultados ponen de manifiesto que la neomicina (5mM) no afecta de manera significativa a la liberación de 20:4 en plaquetas activadas por trombina (2U/ml), registrándose disminuciones de como máximo un 10% en los niveles de 20:4 libre (Graf.27).

6.3.2. Plaquetas estimuladas con ionóforo A23187

Los niveles de 20:4 movilizados por el A23187 (10 μ M) no se ven afectados por la presencia de neomicina (5mM) en el medio de incubación (Graf.27).



Graf.27. EFECTO DE LA NEOMICINA SOBRE LA MOVILIZACION DE 20:4 INDUCIDA POR DIVERSOS AGONISTAS: TROMBINA (2U/ml), IONÓFORO A23187 (10 μ M) Y FLUORURO SÓDICO (30mM) (Todas las reacciones fueron frenadas a los 2 min post-estimulación y realizadas en presencia de calcio 1mM. Las preincubaciones con neomicina (5mM) fueron siempre de 2 min. Media \pm SD de 3 experimentos. El 100% de liberación de 20:4 corresponde al movilizado en ausencia de neomicina)

6.3.3. Plaquetas estimuladas con Fluoruro sódico (NaF)

La neomicina (5mM) potencia la liberación de 20:4 inducida por el NaF (30mM), incrementando en casi un 50% los niveles plaquetarios de 20:4 libre tras la estimulación con este agonista (Graf.27).

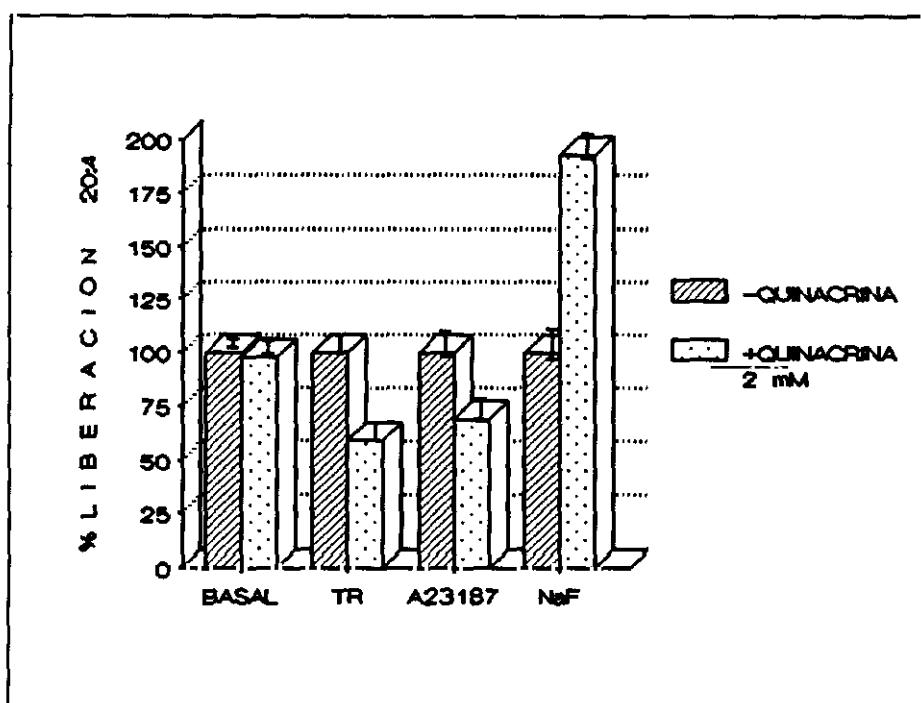
6.4. Efecto de la Quinacrina sobre la liberación de 20:4 inducida por distintos agonistas

Con objeto de evidenciar la existencia de una posible actividad fosfolipasa- A_2 responsable de la liberación de 20:4 a partir de los fosfolípidos de membrana en plaquetas caninas, se llevaron a cabo experimentos para determinar el grado de movilización de 20:4 en presencia de quinacrina (inhibidor de dicha actividad enzimática).

Las preincubaciones con quinacrina fueron siempre de 2 min, frenándose todas las reacciones al cabo de 2 min tras la adición del estímulo.

6.4.1. Estimulación con trombina

La presencia de quinacrina (2 mM) en el medio extracelular, reduce en más de un 40% los niveles de 20:4 liberados en respuesta a la activación por trombina (2U/ml) (Graf.28).



Graf.28.EFECTO DE LA QUINACRINA SOBRE LA MOVILIZACION DE 20:4 INDUCIDA POR DIVERSOS AGONISTAS: TROMBINA (2U/ml), IONOPORO A23187 (10 μ M) Y FLUORURO SODICO (30mM) (Todas las reacciones fueron frenadas a los 2 min post-estimulación y realizadas en presencia de calcio 1mM. Las preincubaciones con quinacrina (2mM) fueron siempre de 2 min. Media \pm SD de 3 experimentos. El 100% de liberación de 20:4 corresponde al movilizado en ausencia de quinacrina)

6.4.2. Estimulación con ionóforo A23187

La quinacrina (2 mM) inhibe en aproximadamente un 30% la liberación de 20:4 inducida por el ionóforo cálcico A23187 (10 μ M) (Graf.28).

6.4.3. Estimulación con Fluoruro sódico (NaF)

La adición de quinacrina (2mM) al medio de incubación, induce sorprendentemente un marcado incremento de los niveles de 20:4 liberados en respuesta a la estimulación con NaF (30 mM), llegando casi a duplicarlos (Graf.28).

7. EFECTO DE LA ALBUMINA DE SUERO BOVINO (BSA) SOBRE LA ACTIVACION PLAQUETARIA

Las dificultades que surgieron durante el proceso de aislamiento y lavado de las plaquetas caninas por su marcada tendencia a la agregación espontánea incluso en presencia de potentes agentes antiagregantes como la PGI₂ (450 ng/ml de medio), nos llevaron a la búsqueda de métodos alternativos que evitaran la activación plaquetaria durante estas fases de los ensayos. Con este fin, procedimos al estudio de los efectos de la adición de BSA a los tampones de lavado e incubación, obteniendo los resultados que se detallan a continuación.

7.1. Efecto de la BSA sobre la secreción plaquetaria

7.1.1. Secreción plaquetaria basal

La presencia de concentraciones de BSA superiores al 0.1 % en el medio de incubación reduce significativamente la secreción basal plaquetaria (Tabla 7).

TABLA 7. EFECTO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE BSA SOBRE LA SECRECION BASAL DE SEROTONINA (El 100% de secreción corresponde a la secreción inducida por trombina a los 2 min post-estimulación en presencia de BSA al 0.1 % ; Media \pm SD de 3 Experimentos)

	<u>BSA-0%</u>	<u>BSA-0.1%</u>	<u>BSA-1%</u>	<u>BSA-3%</u>	<u>BSA-5%</u>
% SECRECION	11% \pm 2	10% \pm 2	8% \pm 3	7% \pm 1	2% \pm 1

7.1.2. Secreción plaquetaria inducida por trombina

La adición de BSA al medio de incubación produce una marcada inhibición de la secreción de serotonina en respuesta a la estimulación por trombina (2U/ml); el efecto inhibitorio de la BSA es dosis-dependiente, apareciendo a concentraciones de BSA superiores al 0.1% (Graf.29). La presencia en el medio de BSA en una proporción del 3% inhibe la secreción en más de un 25%, llegando a ocasionar una inhibición de casi el 100% a concentraciones del 5% (Graf.29).

7.1.3. Secreción plaquetaria inducida por ionóforo A23187

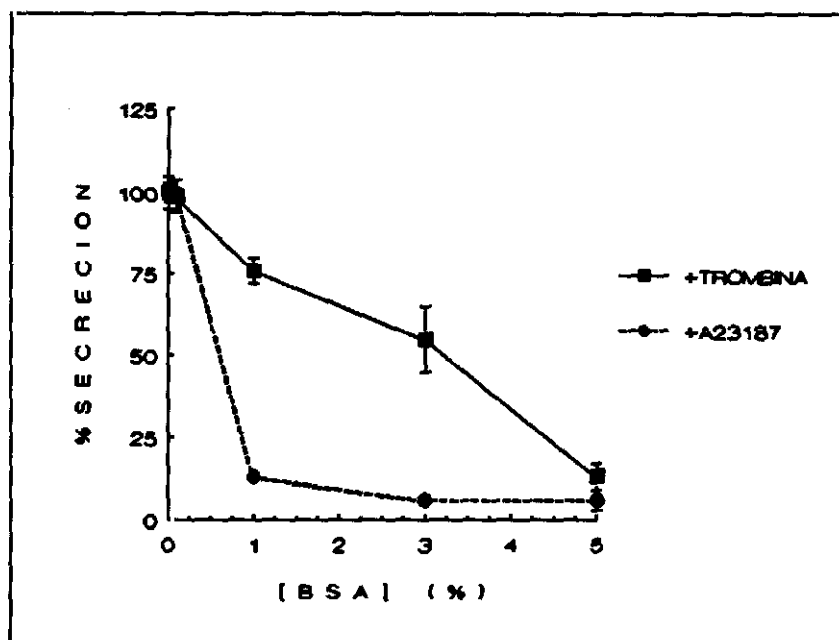
7.1.3.1. Secreción en presencia de Calcio (1mM)

La acción inhibitoria de la BSA sobre la secreción inducida por A23187 es más marcada que la ejercida sobre la secreción estimulada por trombina.

Al igual que en el caso de la trombina, no se observa inhibición con las concentraciones de BSA iguales o inferiores al 0.1 %, pero las concentraciones del 1 %, que

inhibían en un 25% la secreción en respuesta a la trombina (2U/ml), bloquean casi en un 100% la inducida por el A23187 (10 μ M). El efecto inhibitorio seguirá siendo del 100% con las concentraciones superiores de BSA (Graf.29 y Tabla 8).

Graf.29.EFECTO DE LA BSA SOBRE LA SECRECION PLAQUETARIA DE SEROTONINA INDUCIDA POR TROMBINA (2U/ml) O IONOFORO A23187 (10 μ M) (Todas las reacciones fueron frenadas a los 2 min post-estimulación y realizadas en presencia de calcio 1mM. Media \pm SD de 3 experimentos. El 100% de secreción corresponde a la inducida por cada agonista a los 2 min post-estimulación en ausencia de BSA)



7.1.3.2. Secreción en ausencia de Calcio

El grado de inhibición ejercido por la BSA sobre la secreción inducida por A23187 (10 μ M), es prácticamente idéntico en ausencia que en presencia de calcio (1mM).

En ausencia de calcio, las concentraciones de BSA iguales o superiores al 1% inhiben en aproximadamente un 100% la secreción de 5-HT en respuesta al ionóforo (Tabla 8).

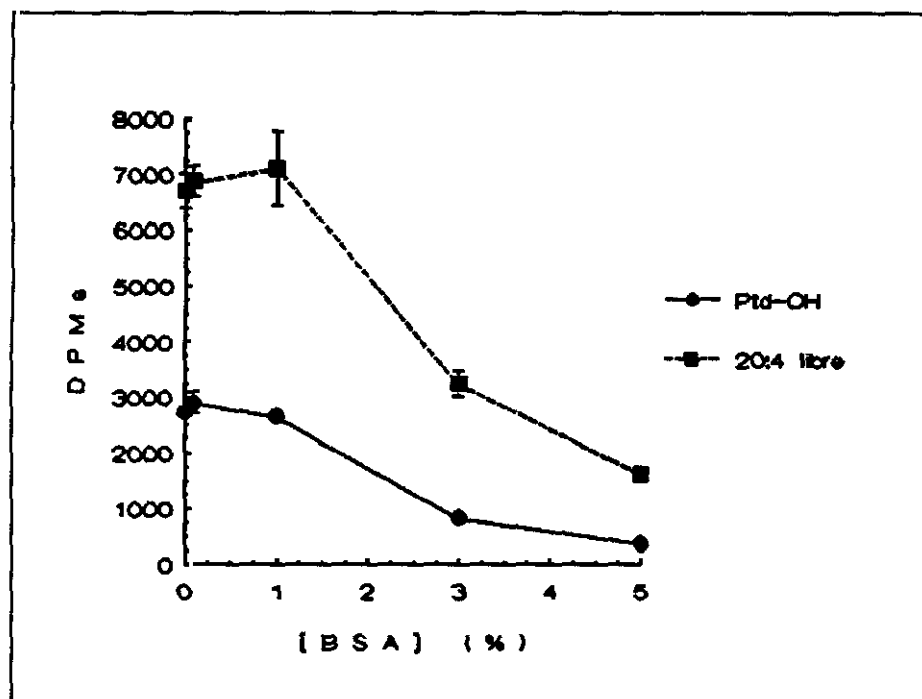
TABLA 8.EFECTO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE BSA SOBRE LA SECRECION DE 5-HT INDUCIDA POR IONOFORO A23187 EN AUSENCIA Y EN PRESENCIA DE CALCIO (1mM). (El 100% de secreción corresponde a la secreción inducida por A23187 (10 μ M) a los 2 min post-estimulación en ausencia de BSA; Media \pm SD de 3 Experimentos)

	<u>BSA-0%</u>	<u>BSA-0.1%</u>	<u>BSA-1%</u>	<u>BSA-3%</u>	<u>BSA-5%</u>
% SECRECION (- Ca ²⁺)	100 \pm 1	99 \pm 3	12 \pm 4	8 \pm 2	7 \pm 2
% SECRECION (+ Ca ²⁺ 1mM)	100 \pm 3	100 \pm 1	13 \pm 2	6 \pm 2	6 \pm 3

7.2. Efecto de la BSA sobre la formación de Ptd-OH

7.2.1. Plaquetas estimuladas por trombina

Nuestros resultados demuestran que la presencia de concentraciones de BSA superiores al 1% en el medio extracelular, induce una drástica inhibición de la formación de Ptd-OH en plaquetas caninas estimuladas con trombina (2U/ml). Esta inhibición se produce de manera dependiente de la dosis, llegando las concentraciones del 5% a reducir los niveles de Ptd-OH incluso por debajo de los contenidos en plaquetas no-estimuladas (Graf.30).



Graf.30. EFECTO DE LA BSA SOBRE LA FORMACION DE ACIDO FOSFATIDICO Y LIBERACION DE 20:4 EN PLAQUETAS ESTIMULADAS POR TROMBINA (2U/ml) (Todas las reacciones fueron frenadas a los 2 min post-estimulación y realizadas en presencia de calcio 1mM. Media \pm SD de 3 experimentos)

7.2.2. Plaquetas estimuladas por ionóforo A23187

La BSA también inhibe drásticamente la formación de Ptd-OH en respuesta a la estimulación por A23187 (10 μ M); la adición de BSA al 3% al medio de incubación, reduce en casi un 75% la producción de Ptd-OH en plaquetas activadas por este agonista (Tabla 10).

7.3. Efecto de la BSA sobre la liberación de 20:4

7.3.1. Plaquetas estimuladas por trombina

La BSA inhibe la liberación de 20:4 en respuesta a la trombina (2U/ml) en un grado similar al descrito para la formación de Ptd-OH. Dicha inhibición comienza a ser manifiesta a partir de concentraciones de BSA del 1%, alcanzándose los niveles máximos a dosis del 5% (Graf.30).

7.3.2. Plaquetas estimuladas por ionóforo A23187

La presencia de concentraciones de BSA del 3% en el medio extracelular, induce una reducción de más del 60% en los niveles de 20:4 liberados en plaquetas estimuladas por ionóforo A23187 (10 μ M) (Tabla 10).

7.4. Efecto de la BSA sobre el metabolismo de 20:4

7.4.1. Plaquetas estimuladas por trombina

La BSA inhibe de forma dependiente de la dosis la formación de 12-HETE en plaquetas estimuladas por trombina (2U/ml); el efecto inhibitorio de la BSA empieza a ser evidente con las concentraciones superiores al 1%, llegando a disminuir la producción de 12-HETE en más de un 70% en presencia de BSA al 5% (Tabla 9).

TABLA.9 EFECTO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE BSA SOBRE LA FORMACION DE 12-HETE INDUCIDA POR TROMBINA

(Todas las reacciones frenadas a los 2 min post-estimulación; Media \pm SD de 3 Experimentos)

	<u>BSA-0%</u>	<u>BSA-0.1%</u>	<u>BSA-1%</u>	<u>BSA-3%</u>	<u>BSA-5%</u>
DPMs 12-HETE	390 \pm 45	415 \pm 38	362 \pm 29	163 \pm 31	102 \pm 12
% Formación	100% \pm 11	106% \pm 10	93% \pm 7	42% \pm 8	26% \pm 3

7.4.2. Plaquetas estimuladas por ionóforo A23187

La síntesis de 12-HETE en plaquetas activadas con ionóforo A23187 es inhibida en casi un 80% por la presencia de BSA al 3% en el medio de incubación (Tabla 10).

TABLA.10. EFECTO DE LA BSA SOBRE LA FORMACION DE Ptd-OH Y LIBERACION Y METABOLISMO DE 20:4 INDUCIDAS POR IONOFORO A23187 (Todas las reacciones frenadas a los 2 min post-estimulación; Media \pm SD de 3 Experimentos)

	<u>+BSA 0.1%</u>	<u>+BSA 3%</u>
DPMs 20:4 (% Liberación)	12.826 \pm 766 (100% \pm 6)	4.645 \pm 326 (36% \pm 2)
DPMs 12-HETE (% Formación)	1.008 \pm 72 (100% \pm 7)	244 \pm 93 (24% \pm 9)
DPMs Ptd-OH (% Formación)	1.012 \pm 179 (100 \pm 17)	279 \pm 65 (27 \pm 6)

8. ULTRAESTRUCTURA DE LAS PLAQUETAS CANINAS

Las plaquetas fueron aisladas y procesadas para su observación bajo microscopía electrónica de transmisión como se describe en el capítulo de Materiales y Métodos.

Todas las estimulaciones se llevaron a cabo con trombina (2U/ml), frenándose las reacciones a distintos tiempos con objeto de estudiar los cambios morfológicos progresivos que experimentan las plaquetas durante su activación.

8.1. Plaquetas en reposo

Las fotos 1 y 2 corresponden a suspensiones de plaquetas caninas en reposo, que también aparecen fotografiadas a mayores aumentos en las fotos 3 (corte transversal) y 4 (corte longitudinal).

En ellas se puede apreciar la característica forma discoide que presentan las plaquetas no-estimuladas, mantenida fundamentalmente por una red circunferencial de microtúbulos (MT) existentes inmediatamente por debajo de la membrana plasmática (MP). Esta última presenta una superficie más o menos regular y homogénea en las células en reposo.

Algunos elementos del Sistema Tubular Denso (DTS) con su contorno tubular típico, aparecen dispuestos en la periferia de la célula, frecuentemente asociados a la banda circunferencial de microtúbulos.

En las plaquetas en reposo, las múltiples organelas intracelulares se encuentran distribuidas de forma heterogénea por todo el citoplasma; en las fotografías se pueden apreciar los abundantes y relativamente voluminosos (300-500 nm de diámetro) gránulos- α (α G) así como los pequeños (200-250 nm) y escasos gránulos densos (DG) dispersos por la matriz citosólica.

Los canales del Sistema Canalicular Abierto (OCS) se difunden por todo el citoplasma, pudiéndose observar en algunos puntos sus aberturas en la membrana plasmática (*), a través de las cuales será evacuado el material granular durante la reacción de secreción.

8.2. Plaquetas activadas

La morfología plaquetaria tras la activación difiere en gran medida de la que presentan las células en reposo.

* En las primeras fases de la activación (2-5 sg tras la adición de la trombina, foto 5), la membrana plasmática se torna irregular, emitiendo una serie de protusiones que posteriormente darán lugar a la formación de pseudópodos.

Al mismo tiempo, se observa un claro desplazamiento de las organelas citoplasmáticas hacia el centro de la célula.

* Al cabo de 5-7 sg tras la estimulación con trombina, todas las organelas a excepción de las mitocondrias se han situado ya definitivamente en el centro celular como consecuencia de la contracción de los microtúbulos periféricos, formando una gran masa electrodensa en el centro de la plaqueta (Fotos 6 y 7).

Por otra parte, la membrana plasmática emite largos pseudópodos que facilitarán la posterior agregación celular (Foto 8).

* A los 10-15 sg post-estimulación, se aprecia ya un grado importante de agregación plaquetaria, aunque probablemente todavía será reversible ya que la mayoría de las células aún no han secretado el contenido de sus gránulos. Sin embargo, algunas de ellas sí han liberado ya el material granular al medio extracelular, apareciendo los gránulos vacíos como grandes vacuolas electrolúcidas (Foto 9).

* Transcurridos 2 min tras la adición de la trombina, la agregación es ya completa e irreversible, observándose abundantes vacuolas en el citoplasma plaquetario que corresponden a los gránulos cuyo contenido ha sido evacuado durante la reacción de secreción (Foto 10).

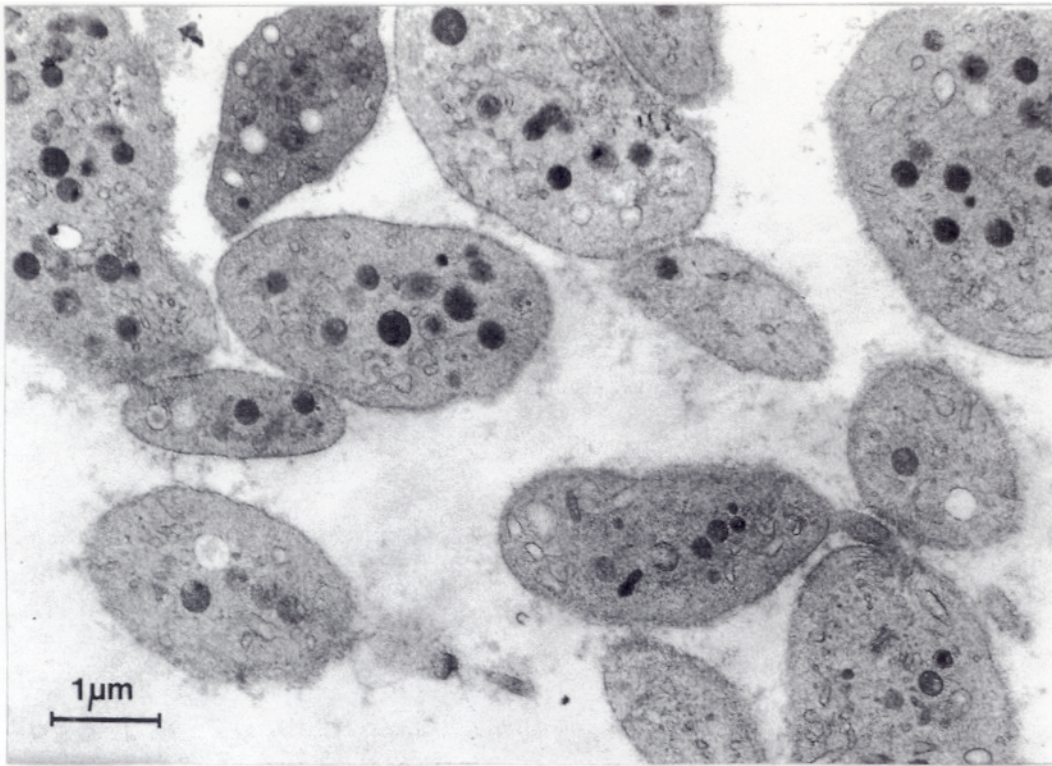


FOTO 1. SUSPENSION DE PLAQUETAS EN REPOSO

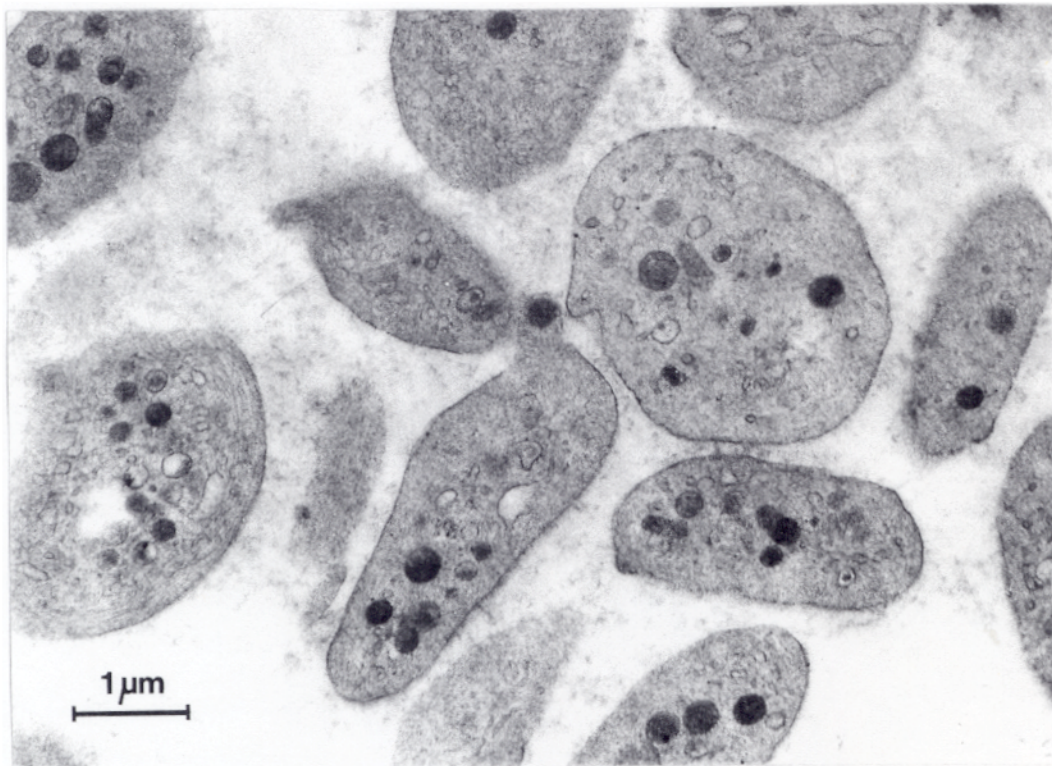


FOTO 2. SUSPENSION DE PLAQUETAS EN REPOSO

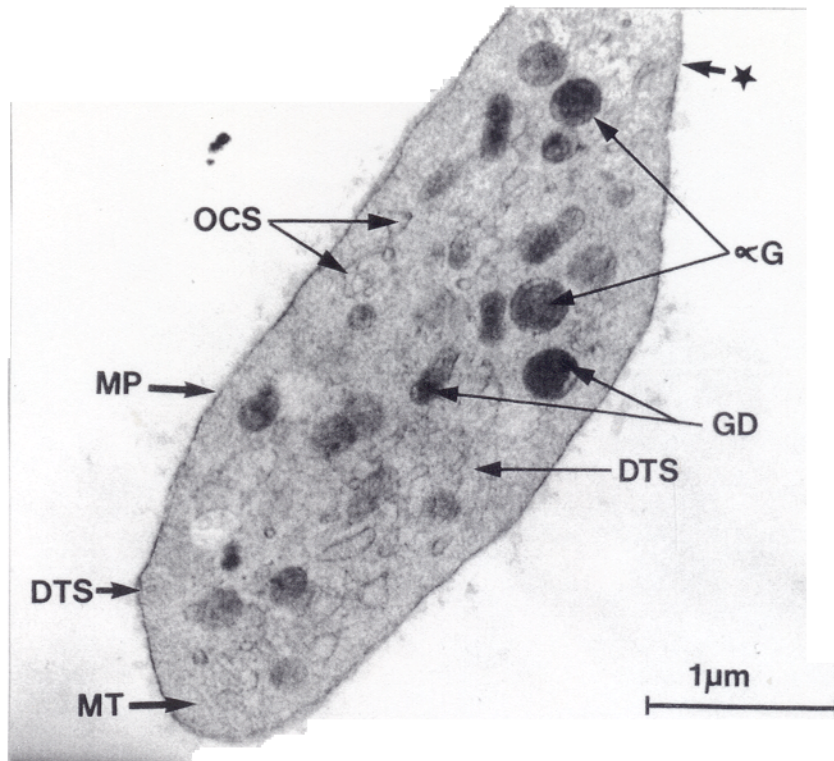


FOTO 3. PLAQUETA EN REPOSO (Corte transversal)

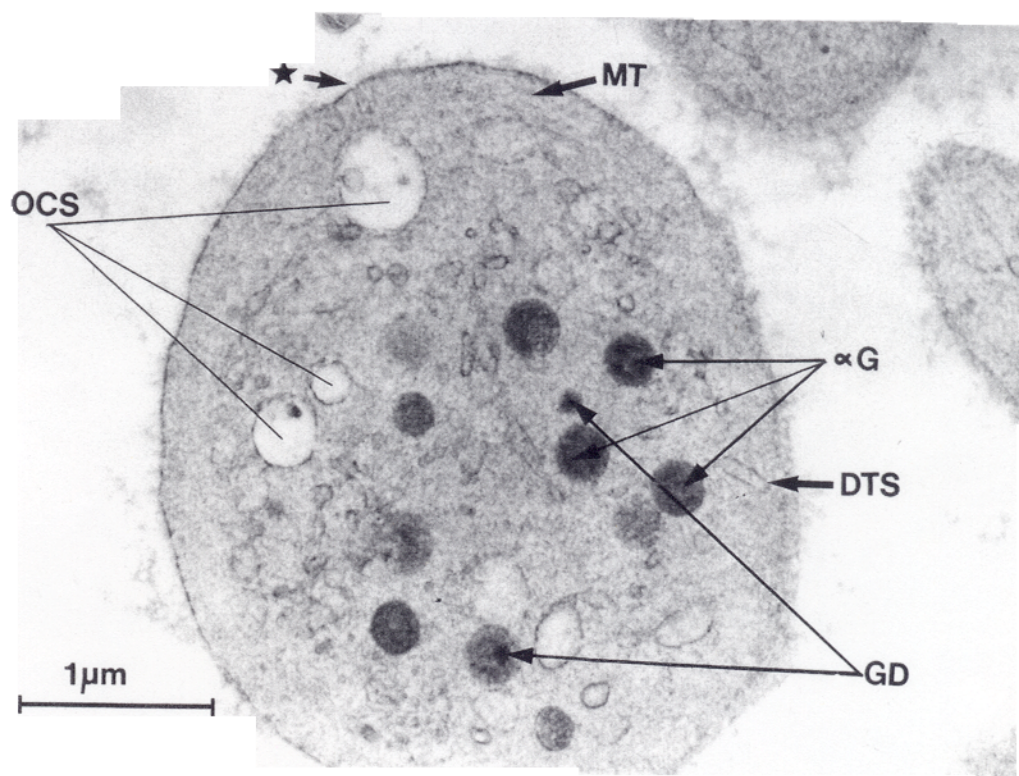


FOTO 4. PLAQUETA EN REPOSO (Corte longitudinal)

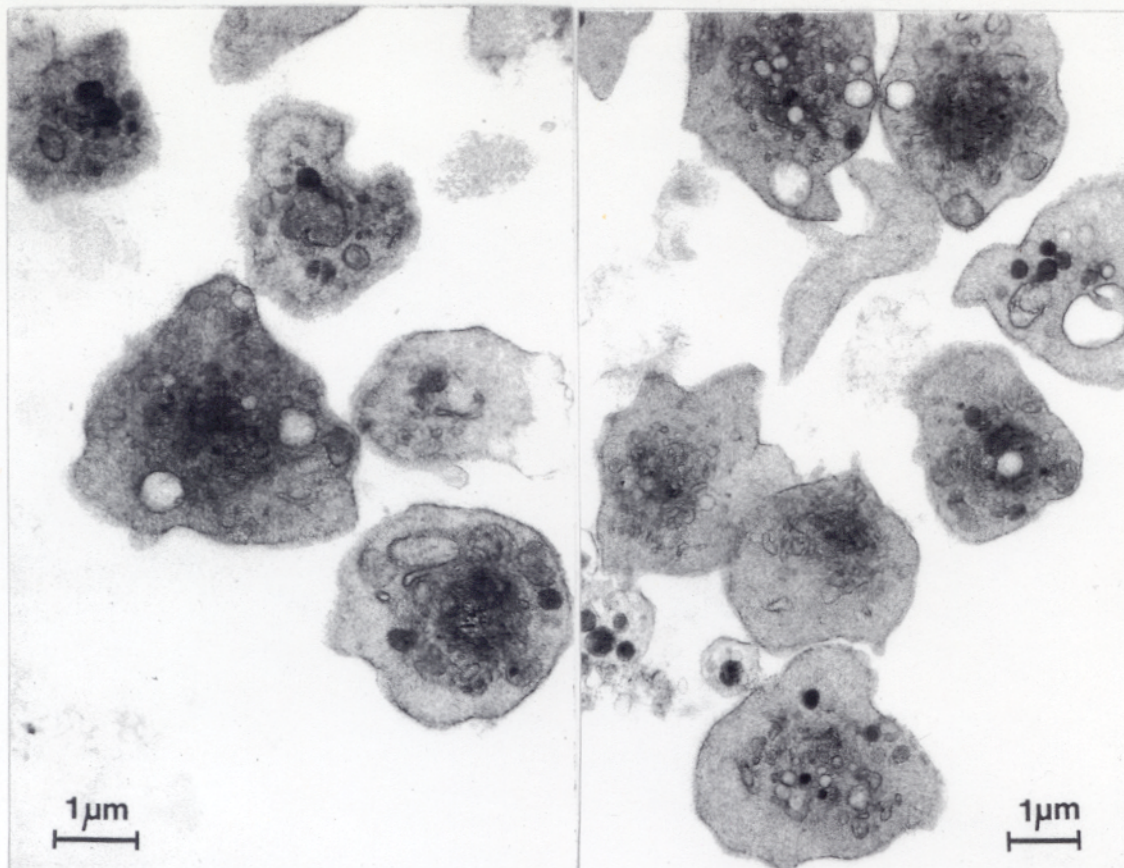


FOTO 5. PLAQUETAS ACTIVADAS POR TROMBINA (2-5 sg post-estimulación)

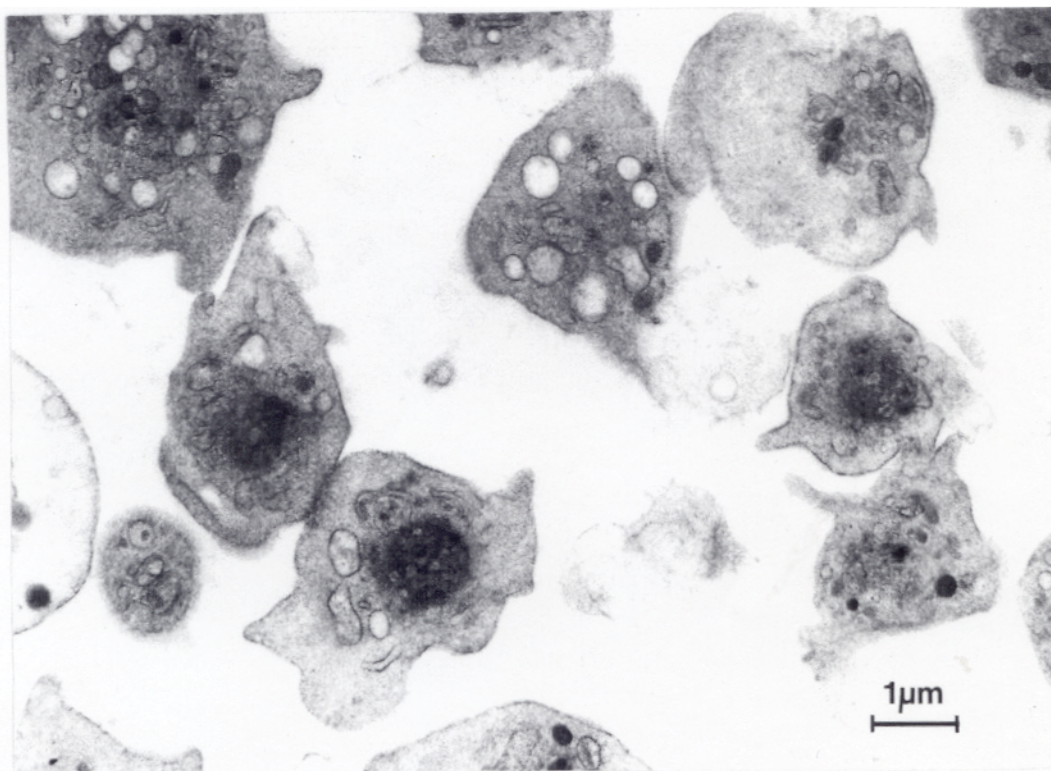


FOTO 6. PLAQUETAS ACTIVADAS POR TROMBINA (5-7 sg post-estimulación)

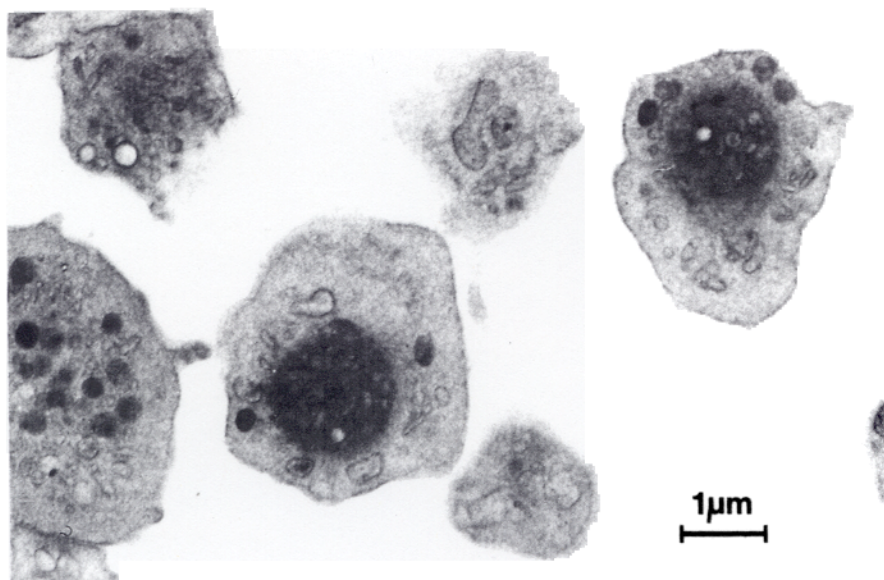


FOTO 7. PLAQUETAS ACTIVADAS POR TROMBINA (5-7 sg post-estimulación)

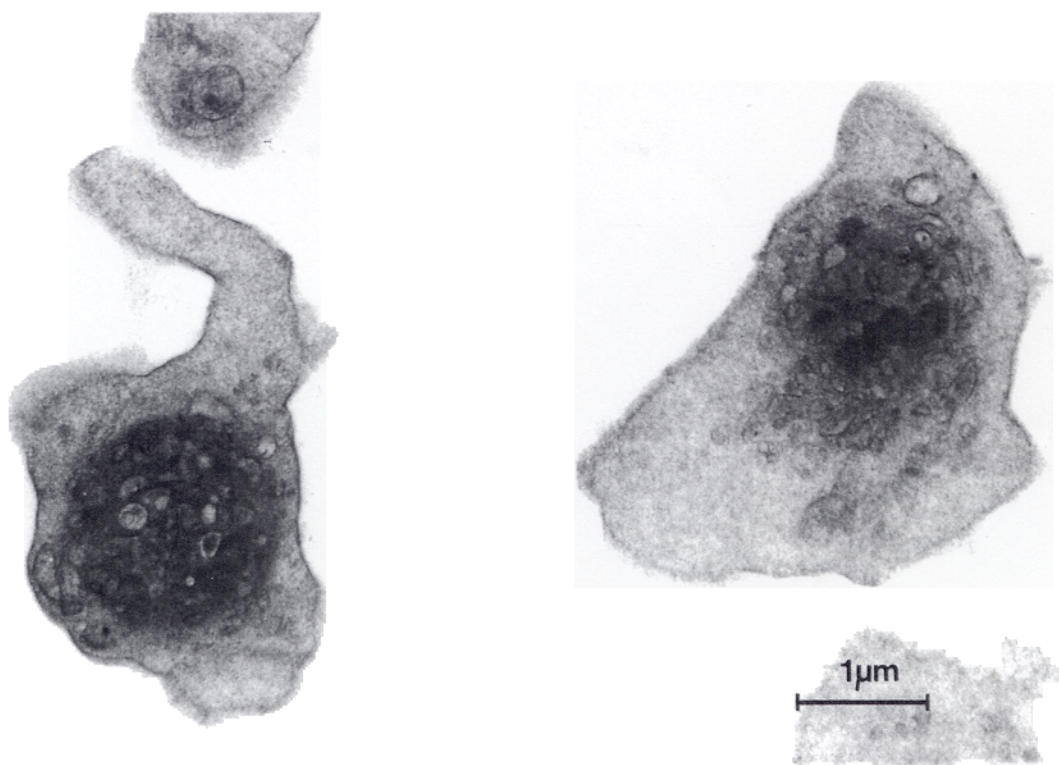


FOTO 8. PLAQUETAS ACTIVADAS POR TROMBINA (7 sg post-estimulación)

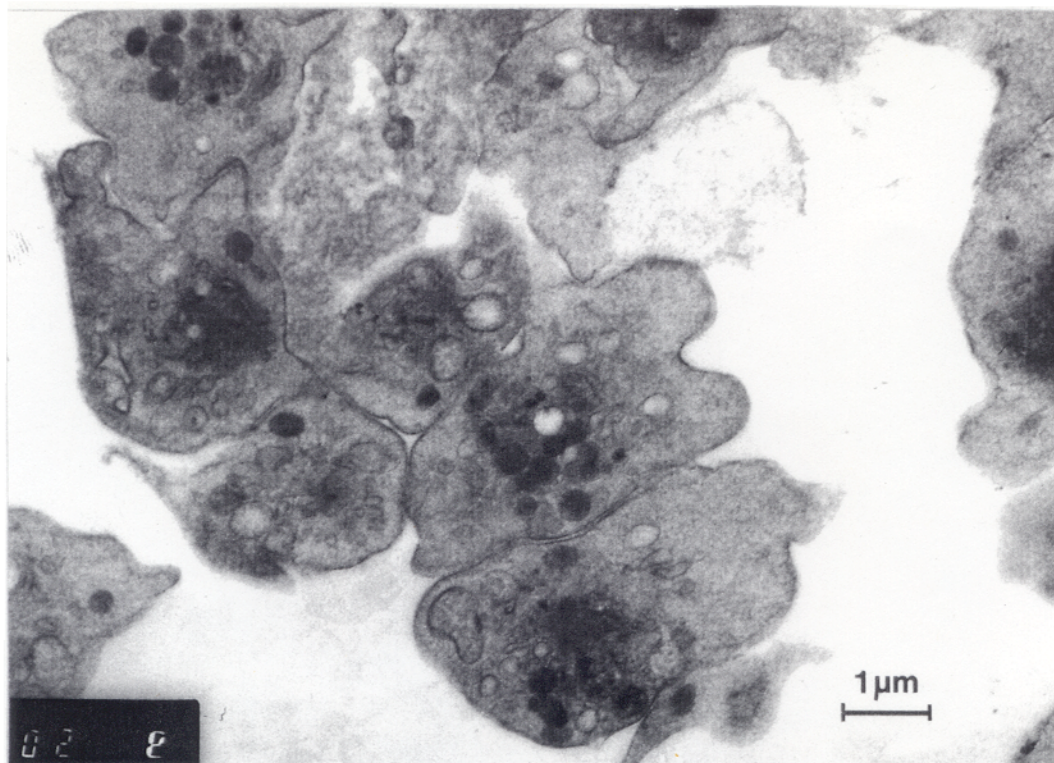


FOTO 9. PLAQUETAS ACTIVADAS POR TROMBINA (10-15 sg post-estimulación)

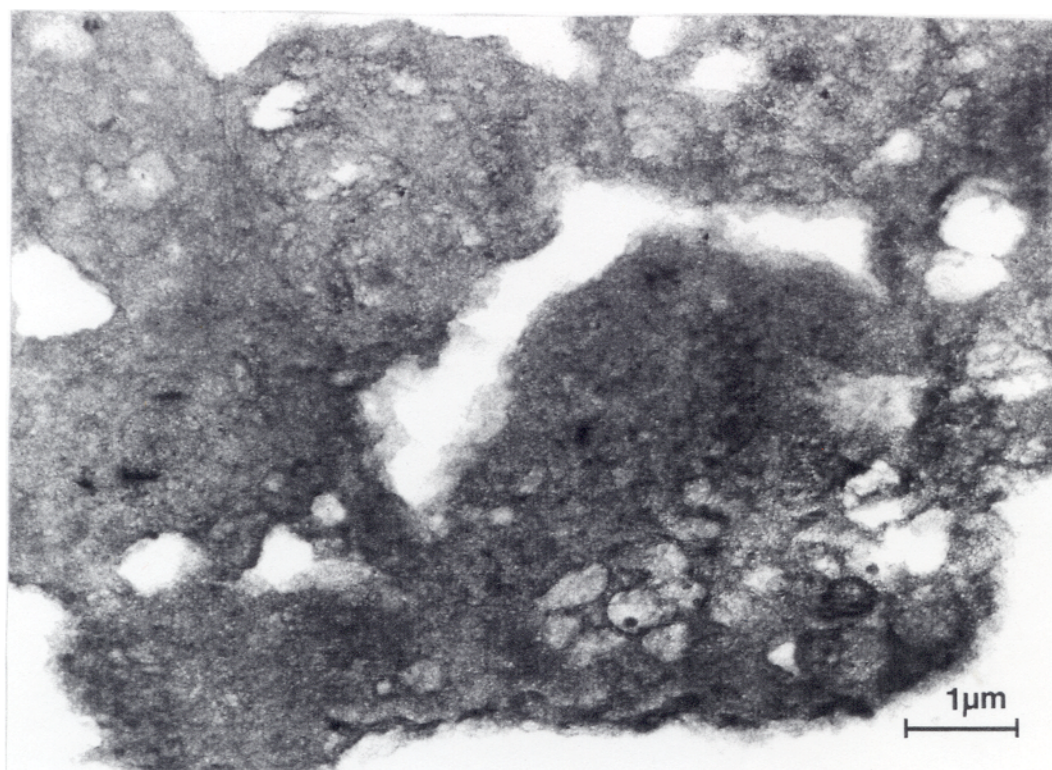


FOTO 10. PLAQUETAS ACTIVADAS POR TROMBINA (2 min post-estimulación)

DISCUSSION

1.- EFECTO DE LA ALBUMINA DE SUERO BOVINO SOBRE LA ACTIVACION PLAQUETARIA INDUCIDA POR TROMBINA Y IONOFORO CALCICO A23187

Las plaquetas procedentes de perros sanos fueron aisladas por centrifugación diferencial como se describe en el apartado de materiales y métodos, siguiendo un procedimiento utilizado muy frecuentemente para el aislamiento de plaquetas en otras especies (209). Sin embargo, es interesante mencionar la gran dificultad que este método plantea en la especie canina por la marcada tendencia a la agregación espontánea que presentan estas plaquetas. Con el fin de prevenir la formación de agregados durante las fases de aislamiento y lavado en nuestro estudio, recurrimos a la adición de un conocido y potente agente antiagregante como es la prostaciclina (PGI_2) (211,401,402) al PRP y al tampón de trabajo, a pesar de lo cual seguía presentándose un elevado índice de agregación espontánea.

Trabajos sobre liberación de plaquetas por megacariocitos en perros (444) han demostrado que la utilización de albúmina de suero bovino (BSA) a concentraciones del 2-3.5% resulta eficaz para la prevención de la agregación espontánea de las plaquetas caninas; basándonos en los resultados de estos autores, decidimos añadir BSA a los medios de aislamiento para evitar la activación plaquetaria durante estas fases del estudio.

Como se puede apreciar en la Graf.29 del capítulo de resultados, la adición de una concentración de BSA del 0.1% no afecta a la secreción plaquetaria inducida por trombina ó A23187, y sin embargo previene en gran medida los fenómenos de agregación espontánea. No obstante, la presencia de concentraciones superiores de BSA en el medio de incubación, inhibe significativamente la secreción en respuesta a trombina y A23187, afectando en mayor grado a la secreción estimulada por este último. Una posible explicación para esta inhibición de la secreción plaquetaria observada en presencia de BSA, podría radicar en la capacidad que posee la BSA para ligarse a numerosos compuestos, de tal forma que podría actuar de quelante de la trombina y/o A23187 reduciendo así los niveles libres de estos agonistas en el medio extracelular. Sin embargo, esta hipótesis queda descartada por el hecho de que la BSA también inhibe la secreción basal de las plaquetas, lo cual indica que la BSA ejerce el efecto inhibitorio por sí misma.

Coincidiendo con los resultados de otros autores en otras especies animales (211,389), hemos podido comprobar que en las plaquetas caninas la secreción de 5-HT inducida por trombina no es un fenómeno dependiente del calcio extracelular, pero sí lo es la inducida por el ionóforo A23187 (211,351). La albúmina a una concentración del 1%, inhibe totalmente la secreción inducida por A23187 y sólo en un 25% la inducida por trombina (Graf.29). Esto podría llevar a pensar que la albúmina está secuestrando el calcio extracelular, inhibiendo de esta forma la acción del ionóforo A23187; sin embargo, como se puede apreciar en la Tabla 8, la albúmina también inhibió totalmente la secreción inducida por el ionóforo A23187 cuando las incubaciones se realizaron en ausencia de calcio extracelular, lo cual excluye esta posibilidad.

Nuestros resultados demuestran que la BSA ejerce su efecto inhibitorio sobre la activación plaquetaria a través de un mecanismo dependiente de la hidrólisis de polifosfoinosítidos, como evidencia la drástica reducción de los niveles de Ptd-OH generados por las plaquetas estimuladas en presencia de BSA.

Por otra parte, las concentraciones de BSA superiores al 1 % inhiben de forma marcada la liberación y el metabolismo de 20:4 en las plaquetas activadas por trombina y especialmente en las estimuladas por A23187. Estos datos explican porqué la BSA inhibe en mayor grado la secreción inducida por A23187, ya que este agonista parece estimular la secreción plaquetaria por un mecanismo dependiente de la movilización y metabolismo de 20:4 (356) mientras que para la trombina existen probablemente vías alternativas no dependientes del metabolismo de este ácido graso (407).

Algunos autores sostienen que la BSA posee efectos inhibitorios sobre la activación plaquetaria por actuar como isomerasa potenciando la transformación de los endoperóxidos cíclicos derivados del 20:4 en prostaglandina-D₂ (inhibidor plaquetario), y reduciendo así la cantidad de TxA₂ (estimulante plaquetario) formado a partir de estos endoperóxidos (445,446). Nuestros resultados no excluyen esta posibilidad, pero demuestran que la BSA ejerce además otras acciones inhibitorias sobre fases más tempranas de la activación plaquetaria, como son la hidrólisis de polifosfoinosítidos y la liberación de 20:4. Si bien todavía no hemos podido esclarecer los mecanismos por los cuales la BSA bloquea estas rutas metabólicas, nos inclinamos a pensar que podrían estar mediados por la inhibición de ciertas actividades enzimáticas tipo fosfolipasa (fosfolipasa-C y fosfolipasa-A₂), posiblemente por ocasionar alteraciones en la fluidez de la membrana celular que dificultarían la accesibilidad del sustrato.

El hecho de que la presencia de BSA al 3 % en el medio de incubación (concentración equivalente a la fisiológica de albúmina sérica en la especie canina) inhiba de forma significativa la activación plaquetaria a varios niveles, hace pensar en un posible papel de la albúmina plasmática como modulador de la funcionalidad plaquetaria en condiciones fisiológicas. Se ha descrito repetidamente la marcada tendencia a la trombosis que presentan los enfermos con síndrome nefrótico tanto en la especie humana (447,448) como en la canina (449,450). Esta predisposición a la trombosis podría deberse entre otros factores a la hipoalbuminemia que padecen estos pacientes como consecuencia de la disfunción renal; de hecho, se ha comprobado *in-vitro* que las plaquetas de estos enfermos son más sensibles de lo normal a los agentes agregantes, condición que desaparece al incrementar los niveles de albúmina del medio extracelular hasta restablecer los valores fisiológicos normales (451).

Los resultados de nuestro trabajo concuerdan con las observaciones de estos autores, en el sentido de que la albúmina reduce la capacidad de activación de las plaquetas *in-vitro*. Si la albúmina plasmática posee o no estos mismos efectos *in-vivo* está todavía sin aclarar, pero consideramos extremadamente interesante investigar esta posibilidad.

Asimismo, apuntamos las posibles aplicaciones de la utilización de albúmina sérica como inhibidor fisiológico de la activación plaquetaria en sangres almacenadas para transfusión y hemoterapia.

En cualquier caso, los resultados obtenidos en el presente trabajo aconsejan la utilización de BSA de forma sistemática como agente antiagregante plaquetario a concentraciones del 0.1% o inferiores, que no afectan a los mecanismos de activación de las plaquetas.

2.- TRANSDUCCION DE SEÑALES EN PLAQUETAS CANINAS

Puesto que la mayoría de los agonistas plaquetarios no son capaces de atravesar la membrana plasmática de estas células, la señal que dispara todos los mecanismos de activación que conducen a la reacción de secreción plaquetaria requiere la existencia de sistemas de transducción para poder ser transmitida a través de la membrana al interior de la célula.

La activación plaquetaria comienza con la interacción del agonista con sus receptores a nivel de la membrana plasmática y culmina con la secreción, exposición de receptores para fibrinógeno y formación de agregados multicelulares. Evidentemente, esta es una descripción muy simple, puesto que la activación plaquetaria no es un proceso lineal, pero puede servir para comprender por qué resulta indispensable la existencia e interacción de múltiples factores estimulantes e inhibidores de diferentes rutas metabólicas en las plaquetas, todos ellos puestos en marcha como consecuencia de la unión del agonista a su receptor. Estas vías afectan fundamentalmente a la concentración de calcio ionizado en el citosol, al estado de fosforilación de determinadas proteínas plaquetarias, a los niveles intracelulares de AMPc, a la hidrólisis de fosfolípidos de membrana y a la liberación y posterior metabolismo de ácido araquidónico.

Prácticamente todos los autores coinciden en que el ataque fosfodiastérico del $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ por una fosfolipasa específica (PLasa-C) es el paso más importante en la cadena de sucesos que conducen a la activación del metabolismo de inosítidos, que finalmente originará la liberación de 1,2-Diacilglicerol e $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ (136,178). Ambos metabolitos actuarán como segundos mensajeros; el 1,2-DAG activará a una proteína-quinasa-C (PKC) dependiente de calcio y fosfolípido (fosfatidilserina), y el $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ regulará los niveles de calcio intracelular induciendo su liberación a partir de los almacenes intracelulares (principalmente del retículo endoplásmico, o sistema tubular denso en la plaqueta), aunque otros autores no descartan la existencia de una posible relación (aún poco conocida) de este inositol-fosfato con los flujos de calcio procedentes del medio extracelular (140,226).

El objetivo principal de este trabajo consiste precisamente en demostrar la participación o no-participación de esta PLasa-C (EC.3.1.4.10) en los fenómenos de secreción plaquetaria, y evidenciar los posibles mecanismos que modulan su acción en plaquetas de perro activadas por dos agonistas completamente diferentes en cuanto a sus

mecanismos de acción, como son la trombina y el ionóforo cálcico A23187.

Con este fin, hemos abordado el estudio de los parámetros básicos de activación plaquetaria en la especie canina, para finalmente establecer sus relaciones con el fenómeno de la secreción.

2.1. Metabolismo de Fosfoinosítidos y formación de Diacilglicerol en plaquetas activadas

Se ha demostrado en varias especies animales que la unión de la trombina a sus receptores en la superficie plaquetaria induce la hidrólisis de los polifosfoinosítidos por acción de la PLasa-C (181,187,188), si bien no hemos podido encontrar información bibliográfica sobre este punto en la especie canina. Los resultados de nuestro estudio indican claramente que la trombina posee este mismo efecto sobre las plaquetas caninas, ocasionando una marcada reducción de los niveles de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ a los pocos segundos de la interacción con su receptor en la membrana plaquetaria. No obstante, el $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ no es el único fosfoinosítido que sufre modificaciones como consecuencia de la activación de las plaquetas por la trombina: el descenso del $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ se acompaña de un incremento de $\text{PtdIns}(4)\text{P}$ que servirá de fuente para la regeneración del $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ que está siendo degradado, observándose también una drástica disminución de los niveles de PtdIns al cabo de 15 sg tras la adición del agonista.

De forma paralela, se producen incrementos significativos del 1,2-DAG intraplaquetario generado como consecuencia de la hidrólisis de los fosfoinosítidos y que actuará como segundo mensajero para activar determinados sistemas efectores intracelulares (300,308). Nuestros resultados demuestran que el máximo de formación de 1,2-DAG en plaquetas caninas activadas por trombina se alcanza a los 15 sg post-estimulación, dato que concuerda con los descritos por otros autores en plaquetas de otras especies (182,205). Se ha sugerido que parte de este 1,2-DAG formado en respuesta a la trombina puede proceder directamente del PtdIns por acción de una PLasa-C específica (172,184,205), modelo que parecen confirmar nuestros resultados; la disminución paralela de los niveles de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ y de PtdIns (tanto del marcado con ^{14}C -20:4 como del marcado con ^3H -glicerol) observada tras la estimulación con trombina, pone de manifiesto que se está produciendo un ataque fosfodiastérico simultáneo de la PLasa-C sobre $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ y PtdIns , como otros autores habían descrito anteriormente (211,172,452). Estos resultados sugieren que el PtdIns también constituye un sustrato fisiológico para la PLasa-C, y no solamente un reservorio para suplir al $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ hidrolizado (206,452). Algunos autores han observado una formación bifásica de diglicérido (453,454,455), que se explicaría por el ataque inicial de la PLasa-C sobre el $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ liberando una primera onda de 1,2-DAG a tiempos de estimulación muy cortos, seguido del ataque de la PLasa-C sobre el PtdIns para generar la segunda y más importante onda de diglicérido. En nuestro sistema, la curva de formación de diglicérido no es bifásica, y tan sólo muestra un incremento masivo a tiempos relativamente cortos (15sg), por lo cual nos inclinamos por la hipótesis del ataque simultáneo de la PLasa-C sobre ambos inosítidos, PtdIns y $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$.

Independientemente de cuál sea la procedencia del 1,2-DAG, todos los autores coinciden en señalar que la misión principal de este segundo mensajero consiste en activar a la proteína-quinasa-C en presencia de calcio y fosfatidilserina (308). Numerosos trabajos sugieren la participación de esta PKC activable por diglicérido en los procesos secretorios de diversos tipos celulares, incluidas las plaquetas (315,316,456,457). Con el fin de esclarecer la posible implicación de esta proteína-quinasa en la secreción plaquetaria, realizamos una serie de experimentos utilizando como agonista un diglicérido exógeno (OAG) capaz de atravesar la membrana plasmática de las células intactas y de activar a la PKC (315,437). Nuestros resultados en plaquetas caninas demuestran claramente la participación de la PKC en los fenómenos de secreción, ya que el OAG estimula la liberación de serotonina por sí mismo, potenciando asimismo la inducida por trombina. En este sentido, es importante señalar que este efecto potenciador del OAG sobre la secreción estimulada por trombina, solamente se produce cuando ambos agonistas se añaden al mismo tiempo; sin embargo, si se realiza una preincubación de 30 sg con el OAG antes de la adición de la trombina, se observa una inhibición de la secreción en respuesta a este último agonista, en lugar de la potenciación descrita anteriormente. La explicación a este fenómeno puede radicar en el grado de activación de la PKC que se haya alcanzado en el momento de añadir la trombina; si ésta se añade cuando la PKC ya está plenamente activada, la secreción resulta inhibida, lo cual concuerda con las supuestas acciones inhibitorias de la PKC en fases tardías de la activación plaquetaria descritas por varios autores (312,326,328,329). Por el contrario, al añadir conjuntamente el OAG y la trombina, se sumarían los efectos estimulantes de ambos agonistas sobre la PKC, hecho que ocasiona un incremento de la secreción. Esto constituye una explicación plausible para los contradictorios resultados obtenidos por distintos autores, ya que algunos de ellos describen efectos inhibitorios del OAG sobre la activación plaquetaria (326,458), mientras que otros aseguran que este agente actúa como estimulante (437,459). El hecho de que el OAG no fuera capaz de inducir la formación de Ptd-OH en nuestro sistema, junto con la observación de que la neomicina (inhibidor de la hidrólisis de polifosfoinosítidos) no afecta a la secreción estimulada por este agonista, excluyen la posibilidad de que el OAG esté ejerciendo algún efecto a nivel del metabolismo de fosfoinosítidos, confirmándose por tanto que sus acciones sobre la funcionalidad plaquetaria están mediadas a través de la activación directa de la PKC.

Algunos autores han sugerido que el 1,2-DAG generado durante la activación celular podría modular la actividad de otros sistemas enzimáticos integrados fundamentalmente por la fosfolipasa-C y la fosfolipasa-A₂, puesto que el DAG es un potente desestabilizante de la membrana y puede hacer el sustrato (fosfolípidos) más asequible a la enzima (289,251,460,461). Nuestros resultados parecen apoyar esta hipótesis, ya que la estimulación de las plaquetas con OAG induce incrementos de los niveles de 20:4 libre, probablemente como consecuencia de su movilización a partir de fosfolípidos de membrana por acción de una fosfolipasa-A₂, si bien también cabe la posibilidad de que la estimulación de la PLasa-A₂ se deba a la alcalinización del citoplasma inducida por la PKC activada (323). Sin embargo, estos datos difieren de los descritos por otros autores, que sostienen que el OAG por sí mismo no estimula la liberación de 20:4 aunque sí potencia la inducida por otros agonistas (462) y por ionóforos cálcicos (316,463).

2.2. Formación de Ptd-OH en plaquetas activadas

Hasta hace poco tiempo, la inmensa mayoría de los autores admitían que la totalidad del Ptd-OH generado durante los fenómenos de activación celular procede directamente del 1,2-DAG por acción de una diglicérido-quinasa, con lo cual la formación de Ptd-OH ha sido frecuentemente utilizada como medida indirecta de la hidrólisis de polifosfoinosítidos (207,208). Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que numerosos agonistas, además de inducir la hidrólisis de los fosfoinosítidos, también originan la degradación de Fosfatidilcolina (PC) por acción de distintas fosfolipasas (PLasa-A₂, PLasa-C y PLasa-D), sugiriendo que estas reacciones pueden estar implicadas en la transducción de señales (124). No obstante, los resultados de nuestros experimentos en células marcadas con ¹⁴C-20:4 y ³H-glicerol indican que, en plaquetas caninas activadas por trombina, la PC es degradada únicamente por una PLasa-A₂ que liberará 20:4, descartando por tanto la posibilidad de que el Ptd-OH sea generado a partir de PC por acción de una PLasa-D. Por otra parte, la adición de neomicina inhibe casi por completo la formación de Ptd-OH inducida por trombina en nuestro sistema, lo cual confirma que la práctica totalidad del Ptd-OH generado proviene de la hidrólisis de fosfoinosítidos vía 1,2-DAG/DAG-quinasa, hipótesis compartida por Lapetina y col. (464) y por otros autores (362).

El único fosfolípido de membrana que experimenta pérdidas significativas del marcaje en ³H-glicerol tras la estimulación de las plaquetas caninas con trombina en nuestras condiciones de ensayo, es el Ptd-Ins; evidentemente, esto sugiere un ataque tipo PLasa-D y/o PLasa-C (discutido anteriormente) sobre este fosfolípido. Balsinde y col. (465) han encontrado actividad PLasa-D específica para PtdIns en neutrófilos humanos, por lo que cabe pensar en la existencia de una actividad enzimática de este tipo en plaquetas. Sin embargo, son pocos los autores que han descrito hasta el momento la presencia de actividad PLasa-D en plaquetas (466), mencionando además que dicha actividad es mucho menor en plaquetas que en otros tipos celulares, por lo que nos inclinamos a pensar que en nuestro sistema, al menos la gran mayoría del Ptd-OH generado durante la activación por trombina deriva del 1,2-DAG por acción de una diglicérido-quinasa.

Sin embargo, la situación es muy distinta en plaquetas caninas estimuladas con ionóforo cálcico A23187; este agonista es capaz de inducir la formación de Ptd-OH, aunque en proporciones mucho menores que la trombina y por otro mecanismo. El A23187 no actúa vía receptor, sino que activa determinados sistemas calcio-dependientes al aumentar la concentración intracelular de calcio (351,467). Nuestros datos concuerdan con este modelo, ya que la producción de Ptd-OH en respuesta a A23187 es muy superior en plaquetas permeabilizadas que en plaquetas intactas. Sin embargo, nuestros resultados indican que el Ptd-OH generado por el A23187 puede proceder de otros fosfolípidos además de los fosfoinosítidos, ya que este ionóforo ocasiona pérdidas significativas del marcaje en ³H-glicerol a partir de PC y PE, que podrían deberse a la acción de fosfolipasas-C y/o -D calcio-dependientes sobre estos fosfolípidos, descritas ya en otros sistemas celulares (129,468). Por otra parte, la neomicina carece de efecto sobre la formación de Ptd-OH inducida por el A23187, lo cual parece confirmar esta hipótesis.

Considerando en conjunto todo lo expuesto anteriormente, podemos deducir que aunque las plaquetas caninas parecen poseer actividad PLasa-D (como demuestra su posible estimulación por acción del ionóforo cálcico A23187 en nuestro sistema), esta actividad enzimática no participa de manera importante en la activación de las plaquetas por trombina, para lo cual proponemos la siguiente explicación: se ha sugerido que la hidrólisis de PC está implicada en los fenómenos de control celular que requieren una activación prolongada de la PKC, tales como regulación de la transcripción y otros eventos relacionados con el crecimiento y diferenciación celular. En este tipo de reacciones, las grandes cantidades de DAG generadas por la acción secuencial de una PLasa-D sobre PC y una fosfohidrolasa sobre Ptd-OH, son necesarias para inducir una activación sostenida de la PKC; sin embargo, es probable que en los fenómenos de estimulación plaquetaria, donde las respuestas de activación inducidas por el agonista se producen en pocos segundos, sean suficientes las cantidades de 1,2-DAG formadas a tiempos cortos por la acción de la PLasa-C sobre los fosfoinosítidos, por lo que el sistema PLasa-D está poco desarrollado en estas células.

2.3. Movilización y metabolismo de ácido araquidónico en plaquetas activadas

Nuestros resultados ponen de manifiesto que, al igual que en otras especies animales (136,363), las plaquetas caninas responden a la estimulación con la liberación intracelular de 20:4. Se han propuesto dos mecanismos principales para la movilización de 20:4 en células activadas: el primero de ellos consiste en la acción secuencial de PLasa-C y DAG- y monoacilglicerol(MAG)-lipasa (165,182,370), y el segundo implica la acción directa de la PLasa-A₂ sobre los fosfolípidos (289,374,389).

En nuestras condiciones de ensayo hemos encontrado evidencias de la liberación de 20:4 por ambas vías;

a) Las pruebas en favor de la ruta PLasa-C, DAG- MAG-lipasa se basan fundamentalmente en el drástico descenso de PtdIns que se produce tras la estimulación con trombina, hecho que apunta al ataque de una PLasa-C sobre este fosfoinosítido como ya han descrito otros autores (211,452). Por otra parte, como se ha mencionado anteriormente, se produce un marcado incremento del Ptd-OH endógeno en las plaquetas activadas como consecuencia de la acción de una diglicérido-quinasa. Sin embargo, el grado de hidrólisis del PtdIns, parece ser mucho mayor que la formación de Ptd-OH, hecho que coincide con los resultados obtenidos previamente por otros autores en otras especies (374), y que sugiere que no todo el DAG liberado de los fosfoinosítidos está siendo convertido en Ptd-OH. Este dato, junto con la observación de que la liberación de 20:4 precede a la síntesis de Ptd-OH (el máximo de 20:4 libre se alcanza a los 60-90 sg postestimulación, mientras que los valores máximos de Ptd-OH se registran a los 2 min), sugieren que parte del DAG generado durante la activación de las plaquetas caninas sirve de sustrato para una diglicérido-lipasa que dará lugar a la liberación de 20:4. Sin embargo, existe un dato en nuestros resultados que indica que esta vía de movilización de 20:4 no es muy importante en las plaquetas de perro: en

nuestras condiciones de ensayo, no hemos detectado incrementos de 1,2-MAG durante la estimulación con trombina, hallazgo que hubiera sido un claro indicativo de la existencia de actividad DAG-lipasa como han descrito otros autores (368,372).

Por otra parte, la inhibición de la liberación de 20:4 inducida por la neomicina en plaquetas estimuladas por trombina, si bien existe, es muy poco importante (no supera el 10%); si la ruta DAG-lipasa, MAG-lipasa fuera la principal responsable de la movilización de 20:4 en plaquetas caninas, la neomicina debería haber ocasionado una mayor inhibición de la liberación de 20:4 al reducir la formación de DAG a partir de fosfoinosítidos.

b) El 20:4 liberado tras la estimulación con trombina puede derivar directamente de los fosfolípidos de membrana. Se ha descrito en plaquetas y en otros tipos celulares la existencia de actividad fosfolipasa-A₂ capaz de actuar sobre varios fosfolípidos, incluyendo PtdIns e incluso Ptd-OH (289,374,389). En nuestro trabajo hemos encontrado numerosas evidencias indicativas de que la activación de la PLasa-A₂ constituye la principal vía de liberación de 20:4 en plaquetas de perro.

En primer lugar, hemos detectado pérdidas significativas del contenido en 20:4 de determinados fosfolípidos (fundamentalmente PtdIns, PC y en menor medida PE) tras la estimulación de las plaquetas con trombina. Las pérdidas máximas coinciden en el tiempo con los niveles máximos de 20:4 libre, lo cual sugiere que los citados fosfolípidos están probablemente sirviendo de fuente para la movilización de 20:4 al igual que ocurre en plaquetas de otras especies (373,374).

La actividad enzimática responsable de esta liberación de 20:4 a partir de los fosfolípidos es calcio-dependiente, como demuestra el hecho de que es activable por ionóforo cálcico A23187; este ionóforo induce reducciones del contenido en 20:4 de los fosfolípidos superiores a las ocasionadas por la trombina, que se acompañan además de incrementos de 20:4 libre mucho mayores que los producidos por este último agonista. Por otra parte, la neomicina no afecta en absoluto a la liberación de 20:4 inducida por el A23187, lo cual parece excluir la posibilidad de que esta reacción esté mediada por el ataque de la PLasa-C sobre los fosfoinosítidos.

Todos estos resultados, junto con el hecho de que las pérdidas del marcaje en ¹⁴C-20:4 que experimentan PC y PE en plaquetas estimuladas por trombina no van asociadas a pérdidas del marcaje en ³H-glicerol, indican claramente la existencia en plaquetas caninas de una actividad PLasa-A₂ activable por trombina y ionóforo A23187. No obstante, estos datos contrastan con los obtenidos por otros autores (470), que han descrito la ausencia de actividad PLasa-A₂ y PLasa-A₁ tanto en la fracción soluble como en membranas de plaquetas de perro, detectando sin embargo actividad PLasa-C y DAG-lipasa. Otros trabajos han puesto de manifiesto que en la mayoría de las ocasiones, la incapacidad para determinar la existencia de actividad PLasa-A₂ se debe a la utilización de condiciones de ensayo inadecuadas, y así, los autores que niegan la existencia de actividad PLasa-A₂ en plaquetas caninas parece que no emplearon unas condiciones de ensayo particularmente óptimas (pH=7 con 0.1 mM de CaCl₂), ya que otros trabajos revelan como condiciones óptimas para determinar actividad

PLasa-A₂, la utilización de un elevado pH y concentraciones altas de calcio (pH=9.5-10 con 10 mM de Ca²⁺) (471).

Algunos autores han descrito la existencia de una actividad PLasa-A₂ específica para Ptd-OH en plaquetas de caballo (388,389), sugiriendo que el propio Ptd-OH formado a partir del DAG iniciaría la estimulación de esta actividad enzimática y la subsiguiente liberación de 20:4. Sin embargo, se ha demostrado posteriormente en plaquetas humanas que la liberación de 20:4 precede a la formación de Ptd-OH (362), contradiciendo así la hipótesis anterior. Estos datos sugieren que ciertas rutas metabólicas plaquetarias pueden presentar variaciones en las distintas especies animales, por lo que procedimos a estudiar estos parámetros de activación en las plaquetas caninas. Nuestros resultados en este aspecto coinciden con los obtenidos por Majerus y col. en plaquetas humanas (362), ya que en plaquetas de perro estimuladas por trombina los niveles máximos de 20:4 se alcanzan antes que los de Ptd-OH, dato que parece descartar al Ptd-OH como fuente de 20:4 en esta especie.

Para confirmar definitivamente la movilización de 20:4 a partir de fosfolípidos de membrana por acción directa de una PLasa-A₂, realizamos una serie de experimentos para establecer los efectos de la Quinacrina (utilizada comunmente como inhibidor de la PLasa-A₂, (441,442)) sobre la liberación de este ácido graso en plaquetas activadas. En nuestro sistema, la quinacrina reduce significativamente los niveles de 20:4 liberados en respuesta a trombina y ionóforo A23187, disminuyendo al mismo tiempo la pérdida de 20:4 a partir de PC, PI y PE. Estos datos indican claramente la participación de la PLasa-A₂ en la movilización de 20:4 en plaquetas caninas estimuladas por estos dos agonistas, sugiriendo además que los fosfolípidos que sirven como sustrato para esta enzima son PI, PC y en menor medida PE, resultados que coinciden plenamente con los obtenidos por otros autores en plaquetas de otras especies (373,374). Sin embargo, es importante reseñar el hecho de que en nuestro sistema la quinacrina parece tener también efectos inhibitorios sobre la PLasa-C plaquetaria, como demuestra el bloqueo de la hidrólisis de fosfoinosítidos observado en presencia de este inhibidor. Esta inhibición de la PLasa-C por acción de la quinacrina había sido descrita anteriormente en otros tipos celulares (472,473), pero no hemos encontrado ninguna referencia al respecto en plaquetas. En consecuencia, no excluimos la posibilidad de que el bloqueo de la hidrólisis de PI producido en presencia de quinacrina se deba más bien a la inhibición de la actividad PLasa-C en lugar de la PLasa-A₂, por lo que la contribución de este fosfoinosítido a la liberación de 20:4 en plaquetas caninas es dudosa (este no es el caso para PC y PE, ya que previamente habíamos descartado el ataque de una PLasa-C sobre estos fosfolípidos en plaquetas estimuladas por trombina).

Una vez liberado en el interior de la plaqueta, el 20:4 puede ser metabolizado por la vía lipooxigenasa y/o ciclooxigenasa, siendo esta última la ruta preferencial en plaquetas (394); en nuestro estudio hemos podido comprobar que en plaquetas caninas, el 20:4 es metabolizado por ambas vías, como demuestra la formación de metabolitos oxigenados activos derivados de ambas actividades enzimáticas, si bien el compuesto más abundante es efectivamente el producto principal de la vía ciclooxigenasa, el Tromboxano-A₂.

2.4. Participación de Proteínas-G-reguladoras en la activación plaquetaria

El estudio de las proteínas-G ha adquirido una gran importancia en los últimos tiempos, ya que cada vez son más numerosos los procesos metabólicos en los que se ha demostrado la participación de estas proteínas reguladoras como mediadoras de las interacciones entre los receptores de membrana y los mecanismos efectores intracelulares. Entre los sistemas controlados por estas proteínas-G se encuentran determinadas actividades enzimáticas tipo fosfolipasa, como la PLasa-C (126,139,151), la PLasa-A₂ (124,125,386,474,475,476,477) y posiblemente también la PLasa-D (478,479,128,129). Dado que al menos algunas de estas actividades enzimáticas están implicadas en los fenómenos de activación plaquetaria, consideramos importante estudiar la posible participación de proteínas-G en sus mecanismos de activación en plaquetas caninas. Con este objeto, realizamos una serie de experimentos utilizando como agonistas plaquetarios dos conocidos estimulantes de las proteínas-G: en primer lugar, el Fluoruro sódico (NaF), el cual en presencia de AlCl₃ da lugar a la formación de fluoroaluminato (AlF⁺) que sustituye al γ -fosfato del GTP activando así a las proteínas-G (434,435). En segundo lugar, el GTP γ S, un análogo no hidrolizable del GTP que al unirse a la subunidad- α ocasiona una activación sostenida de estas proteínas (436).

Nuestros resultados con estos agonistas demuestran claramente la participación de proteínas-G-reguladoras en la activación de las plaquetas caninas, ya que tanto el NaF (en plaquetas intactas) como el GTP γ S (en plaquetas permeabilizadas) son capaces de inducir la secreción plaquetaria de serotonina, llegando a alcanzar niveles de secreción similares a los estimulados por la trombina. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores (135,136,480), si bien en nuestro sistema fueron necesarias concentraciones de NaF superiores (> 20mM) a las utilizadas en estos trabajos para inducir la secreción plaquetaria. Nuestros resultados están por tanto en claro desacuerdo con los obtenidos por Kienast y col. (141), quienes sostienen que concentraciones de NaF superiores a 40 mM inhiben la activación plaquetaria por estimular el sistema adenilato-ciclasa.

El hecho de que el NaF induzca la formación de Ptd-OH, parece indicar que este agonista está promoviendo la estimulación de las plaquetas caninas por activar una proteína-G reguladora de la fosfoinositidasa que hidroliza los polifosfoinosítidos, descrita ya por otros autores en plaquetas de otras especies (139,151) aunque todavía sin identificar. Sin embargo, los resultados de los experimentos realizados en presencia de neomicina contradicen esta hipótesis: la neomicina potencia en gran medida la secreción inducida por GTP γ S y NaF, así como la síntesis de Ptd-OH en respuesta a este último agonista. Estos datos ponen de manifiesto que los activadores de proteínas-G son capaces de inducir la estimulación plaquetaria por vías diferentes de la hidrólisis de polifosfoinosítidos, o lo que es lo mismo, que las plaquetas caninas disponen de rutas de activación alternativas en las que no participa el metabolismo de fosfoinosítidos, y que de alguna forma están mediadas por proteínas-G reguladoras. En los últimos años se han encontrado numerosas evidencias que apuntan a la existencia de un mecanismo regulador de la actividad PLasa-A₂ mediado por una proteína-G sobre el cual se han emitido dos hipótesis: por un lado, la proteína implicada podría ser

la propia Gp activadora de la PLasa-C, que al generar $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, daría lugar a incrementos de la concentración citosólica de calcio que favorecerían la estimulación de la PLasa-A₂ (481), y por otra parte, se ha propuesto la existencia de una nueva proteína-G, todavía desconocida, responsable de la activación directa de la PLasa-A₂ (125,386,387). Nuestros resultados encajan mejor en este último modelo, ya que el bloqueo de la actividad PLasa-C por acción de la neomicina no sólo no inhibe la liberación de 20:4 inducida por NaF, sino que la potencia, lo cual indica claramente que la movilización de 20:4 en respuesta al NaF es completamente independiente de la hidrólisis de polifosfoinosítidos. Para esclarecer este aspecto, realizamos varios experimentos en presencia de quinacrina, pensando que al inhibir la PLasa-A₂ se bloquearía también la liberación de 20:4 inducida por el NaF. Sin embargo, los resultados obtenidos fueron contrarios a los esperados: sorprendentemente, la quinacrina potencia de manera significativa la liberación de 20:4 en respuesta a la estimulación por NaF. La posibilidad de que la quinacrina no esté inhibiendo la PLasa-A₂ en nuestras condiciones de ensayo queda excluida, ya que los resultados en plaquetas activadas por trombina y ionóforo A23187 demuestran que sí existe este efecto inhibitorio. Por otra parte, la observación de que la quinacrina también bloquea la actividad PLasa-C, descarta la posibilidad de que el 20:4 liberado por el NaF en presencia de este inhibidor proceda del DAG derivado de los polifosfoinosítidos. Por lo tanto, estos datos sugieren que en plaquetas caninas existe una vía de liberación de 20:4, distinta de la mediada por la PLasa-C/Diglicérido-lipasa y de la mediada por la PLasa-A₂, en cuyo mecanismo de activación participa una proteína-G reguladora. Basándonos en resultados obtenidos por otros autores en diferentes sistemas celulares (129), nos inclinamos a pensar que esta nueva ruta de movilización de 20:4 plaquetario, podría estar constituida por la activación de una PLasa-D que actuaría sobre PC liberando Ptd-OH, el cual podría ser atacado por una PLasa-A₂ específica (389) (aunque nuestros datos en plaquetas estimuladas por trombina indican que esta actividad enzimática sobre el Ptd-OH es poco probable en plaquetas caninas), o bien ser defosforilado y convertido en DAG para dar lugar finalmente a 20:4 libre (369,482). Todas las actividades enzimáticas implicadas en esta hipotética ruta (Plasa-D, Ptd-OH-fosfohidrolasa, DAG- MAG-lipasa) están presentes en plaquetas (369,466), y por otra parte la posible participación de una proteína-G en la activación de la PLasa-D en diversos tipos celulares ya ha sido propuesta por varios autores (128,129,478,479), por lo cual es muy posible que exista un mecanismo similar en plaquetas.

Por otra parte, existe otro dato importante en nuestros resultados que parece confirmar la teoría de la estimulación de una PLasa-D por el NaF como vía de activación alternativa a la hidrólisis de polifosfoinosítidos: en presencia de neomicina y coincidiendo con el aumento de los niveles de Ptd-OH, se produce una considerable disminución del marcaje en ^{14}C -20:4 y ^3H -Glicerol de PC, mientras que en ausencia de este antibiótico, el marcaje de PC permanece prácticamente inalterado tras la activación de las plaquetas con NaF.

Por otra parte, el hecho de que el NaF potencie la secreción y la formación de Ptd-OH inducidas por la trombina, sugiere que este agente es capaz de poner en marcha vías de activación complementarias a las estimuladas por la trombina.

Considerando en conjunto todo lo expuesto sobre los posibles mecanismos mediados

por proteínas-G en plaquetas, y basándonos en nuestros propios resultados y en los obtenidos previamente por otros autores, proponemos el siguiente modelo mediante el cual se podrían explicar los resultados discutidos anteriormente: el mecanismo principal de activación plaquetaria estaría constituido al igual que en otros tipos celulares por la hidrólisis de polifosfoinosítidos, la cual está mediada por la activación de una proteína-G (Gp) que estimula la actividad PLasa-C. Este sería probablemente el sistema de activación estimulado por los agonistas plaquetarios fuertes como la trombina, que inducen las respuestas de activación de forma extraordinariamente rápida, sin necesitar por tanto la participación de mecanismos amplificadores que prolonguen o incrementen la señal de activación. Sin embargo, las plaquetas dispondrían de rutas de activación alternativas, mediadas también por proteínas-G, que podrían ponerse en marcha en respuesta a agonistas más débiles que requieran una estimulación prolongada de determinadas rutas metabólicas (como por ejemplo una activación sostenida de la PKC), o por agonistas que simplemente posean diferentes mecanismos de acción (mediados por receptores acoplados a otras proteínas-G-reguladoras distintas de Gp).

Además, cabe la posibilidad de que existan interacciones entre los distintos sistemas enzimáticos controlados por proteínas-G, de forma que al bloquear uno de ellos se estimulen los demás; esto explicaría el efecto potenciador de la neomicina sobre la activación inducida por NaF, así como el incremento de la liberación de 20:4 ocasionado por la quinacrina.

Los resultados de algunos trabajos recientes (135) concuerdan perfectamente con nuestra hipótesis sobre la existencia de rutas de activación plaquetaria mediadas por proteínas-G y distintas de la hidrólisis de polifosfoinosítidos; estos autores han demostrado que en plaquetas humanas, el NaF no induce la formación de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, pero sí la de 1,2-DAG, así como la fosforilación del sustrato principal de la PKC, la p47. Estos datos indican claramente que el DAG generado por el NaF en este estudio no procede de polifosfoinosítidos, al igual que sucede en nuestros experimentos realizados en presencia de neomicina. Por lo tanto, nuestros resultados coinciden plenamente con los de estos autores y con sus teorías sobre la existencia de una nueva vía de activación plaquetaria consistente en la formación de DAG a partir de PC por acción de fosfolipasas-C y/o -D.

La participación de proteínas-G en la regulación de estas fosfolipasas plaquetarias calcio dependientes (PLasa-A₂ y PLasa-D) como indican nuestros resultados, constituiría una explicación para el mecanismo de acción de los agonistas que como la epinefrina no inducen la hidrólisis de polifosfoinosítidos ni tampoco aumentos de la concentración citosólica de calcio, pero sin embargo ocasionan una activación plaquetaria completa (25,295).

2.5. Participación de distintas rutas metabólicas en los fenómenos de secreción plaquetaria

Después de analizar algunas de las principales rutas metabólicas que se ponen en marcha durante la activación plaquetaria, nos propusimos determinar sus posibles relaciones con la liberación de serotonina inducida por los distintos agonistas, con el fin de establecer

el grado de participación de cada una de ellas en los fenómenos de secreción.

2.5.1.- Hidrólisis de Polifosfoinosítidos

En la actualidad existe cierta controversia acerca de la participación del metabolismo de inosítidos en los fenómenos de secreción plaquetaria de 5-HT. Nuestros experimentos demuestran que en plaquetas permeabilizadas con saponina, se puede estimular la secreción de 5-HT simplemente mediante la adición de calcio ($0.1\mu\text{M}$), siempre que exista ATP en el medio de incubación. (La necesidad de ATP se debe a que el tratamiento con saponina parece ocasionar la depleción de los almacenes intracelulares de ATP (218,248,483)). Estos resultados indican que el proceso de secreción plaquetaria se pone en marcha a través de un mecanismo calcio-dependiente para cuya estimulación son suficientes las concentraciones de calcio presentes en las células en reposo ($0.1\mu\text{M}$), y que consiste muy probablemente en la activación de la PLasa-C específica para fosfoinosítidos como ya han descrito otros autores (147,148,154).

Para establecer con mayor exactitud el grado de participación de esta fosfoinositidasa en la reacción de secreción, se realizaron experimentos en presencia de sulfato de neomicina; como se ha mencionado anteriormente, este antibiótico se une fuertemente a los polifosfoinosítidos (438) y un gran número de estudios sugieren que puede ser utilizado como inhibidor relativamente específico de la hidrólisis de fosfoinosítidos (439,440). En nuestro sistema, concentraciones de neomicina de 5 mM inhiben en un 75 % la secreción inducida por trombina (porcentaje de inhibición idéntico a la reducción de Ptd-OH ocasionada por este antibiótico), bloqueándose la secreción en prácticamente un 100% en presencia de neomicina 10 mM. Sin embargo, como cabía esperar, la neomicina no afecta en absoluto a la secreción estimulada por el ionóforo A23187, mientras que por el contrario potencia la inducida por NaF y GTP γ S. Estos resultados demuestran claramente que si bien la secreción de serotonina estimulada por la trombina es totalmente dependiente de la hidrólisis de fosfoinosítidos, existen no obstante rutas alternativas para la inducción de la secreción plaquetaria, activables por calcio y/o por proteínas-G como ya han propuesto algunos autores (135,386,387).

2.5.2.- Metabolismo de 20:4

Tradicionalmente se ha venido considerando que la liberación de 20:4 y su posterior conversión en metabolitos oxigenados activos (fundamentalmente TxA₂), eran fenómenos imprescindibles para que se pudiera producir la secreción plaquetaria en varias especies incluyendo la canina (209,407,408,484), si bien algunos autores ya habían sugerido que era posible inducir la secreción de serotonina en ausencia de metabolitos del 20:4 (407,413).

En un intento de aclarar este punto, realizamos varios experimentos en presencia de inhibidores de ciertas actividades enzimáticas, para establecer en qué medida influye la inhibición de la liberación y/o metabolismo del 20:4 sobre la secreción inducida por diversos agonistas.

En primer lugar, hay que destacar que la movilización de 20:4 no es suficiente para

que se produzca secreción en respuesta a trombina, ya que la preincubación de las plaquetas con neomicina solamente reduce en un 10% la liberación de 20:4, pero sin embargo inhibe en casi un 100% la secreción. Esta observación parece indicar la participación de procesos calcio-dependientes (como por ejemplo la activación de la MLCK por la calmodulina) en los fenómenos de secreción plaquetaria, ya que la inhibición del incremento de calcio citosólico ocasionada por la neomicina al bloquear la formación de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, anula casi por completo la secreción en respuesta a trombina. Sin embargo, como cabía esperar, la neomicina no afecta a la secreción inducida por A23187 porque este último aumenta la concentración intracelular de calcio por mecanismos independientes de la hidrólisis de polifosfoinosítidos.

Otro dato que demuestra que el metabolismo del 20:4 no es un factor indispensable dentro del mecanismo secretor de las plaquetas, es el hecho de que el pretratamiento de las plaquetas con inhibidores de la movilización de 20:4 (quinacrina) o de su metabolismo por la vía ciclooxygenasa (indometacina), inhiben solo parcialmente la secreción inducida por trombina o ionóforo A23187, lo cual pone de manifiesto que en el proceso secretor están involucrados sistemas independientes de la liberación y posterior metabolismo de 20:4.

En plaquetas estimuladas por ionóforo cálcico A23187, la quinacrina e indometacina tan sólo inhiben la secreción en un 50%, cuando era de esperar un efecto inhibitorio mucho más elevado, ya que se ha descrito que la activación plaquetaria inducida por el A23187 está mediada fundamentalmente por la liberación y posterior metabolismo de 20:4 (356). Nuestros datos indican que la participación de los metabolitos oxigenados del 20:4 en la secreción inducida por el ionóforo A23187 no es tan definitiva como algunos autores habían postulado; es evidente que el ionóforo A23187 está activando otra/s vía/s calcio-dependiente/s implicada/s en los procesos secretores de la plaqueta de perro.

En consecuencia, nuestros resultados indican que las rutas de activación puestas en marcha por la trombina y el ionóforo A23187 en plaquetas caninas son completamente diferentes; el A23187 estimula la secreción por un mecanismo totalmente independiente de PLasA-C y parcialmente dependiente de PLasA-A_2 , que no implica necesariamente la participación de la movilización de 20:4. Por otra parte, la acción de la trombina es completamente dependiente de PLasA-C , pero solamente en un 50% de la liberación de 20:4.

2.5.3.- *Proteínas-G-reguladoras*

El mecanismo por el cual el NaF induce la secreción plaquetaria es bastante complejo y poco conocido. Como hemos mencionado anteriormente basándonos en nuestros resultados, este agente parece capaz de estimular tres vías diferentes de activación: inicialmente, activa la proteína-Gp que induce la hidrólisis de polifosfoinosítidos desencadenando así la secreción. Si se bloquea esta ruta (mediante la adición de neomicina) se potencian otras vías activables por NaF y por tanto mediadas por proteínas-G, constituidas probablemente por la estimulación de la PLasA-A_2 y/o PLasA-D , lo cual se traduce en un incremento de la secreción. No obstante, al bloquear simultáneamente las actividades PLasA-C y PLasA-A_2 (mediante la adición de quinacrina) se produce cierta inhibición de la secreción que sin

embargo se acompaña de un gran aumento de los niveles de 20:4 libre. Estos últimos resultados son ciertamente sorprendentes, ya que por lo general se considera que el 20:4 movilizado actúa como mediador de la activación celular, por lo cual hubiera sido más lógico que el aumento de los niveles de 20:4 libre hubiera ido asociado a un incremento y no a una disminución de la secreción como ha sido el caso. Sin embargo, varios trabajos han demostrado que el 20:4 a concentraciones elevadas ejerce marcados efectos inhibitorios sobre la activación plaquetaria (391,485,486) descritos también en la especie canina (487,488), probablemente porque al aumentar en exceso los niveles de este ácido graso, éste es metabolizado mayoritariamente por la vía lipooxigenasa, dando lugar a la formación de grandes cantidades de 12-HPETE y 12-HETE (391). La acción inhibitoria de estos dos metabolitos del 20:4 sobre la activación plaquetaria ha sido descrita en varias ocasiones (391,392), habiéndose comprobado su capacidad para bloquear la actividad ciclooxygenasa (393). En base a nuestros resultados, consideramos muy probable que la inhibición de la secreción ocasionada por la quinacrina esté mediada de alguna forma por un bloqueo de la ciclooxygenasa, ya que el porcentaje de inhibición inducido por la quinacrina sobre la secreción en respuesta al NaF es muy similar al originado por la indometacina.

En consecuencia, el gran incremento de los niveles de 20:4 libre inducido por la quinacrina en plaquetas estimuladas por NaF podría ser precisamente el responsable de la inhibición de la secreción, si bien no excluimos la posibilidad de que la quinacrina esté ejerciendo algún otro efecto no detectado que pudiera estar interfiriendo el proceso secretor a otros niveles. Por lo tanto, consideramos necesario profundizar en el estudio de los efectos de los distintos inhibidores metabólicos utilizados más frecuentemente en plaquetas, ya que un mejor conocimiento de sus mecanismos de acción constituiría una valiosa ayuda para estudiar de manera individualizada las diferentes rutas de activación de estas células.

De todo lo expuesto se deduce que, si bien la hidrólisis de polifosfoinosítidos parece ser la principal vía de activación implicada en el proceso secretor de las plaquetas, existen además otras rutas de estimulación alternativas capaces también de inducir la secreción plaquetaria de serotonina.

En la Fig. 13 aparece un esquema de las posibles proteínas-G-reguladoras de distintas actividades enzimáticas que podrían participar en los fenómenos de activación plaquetaria en base a los resultados del presente trabajo.

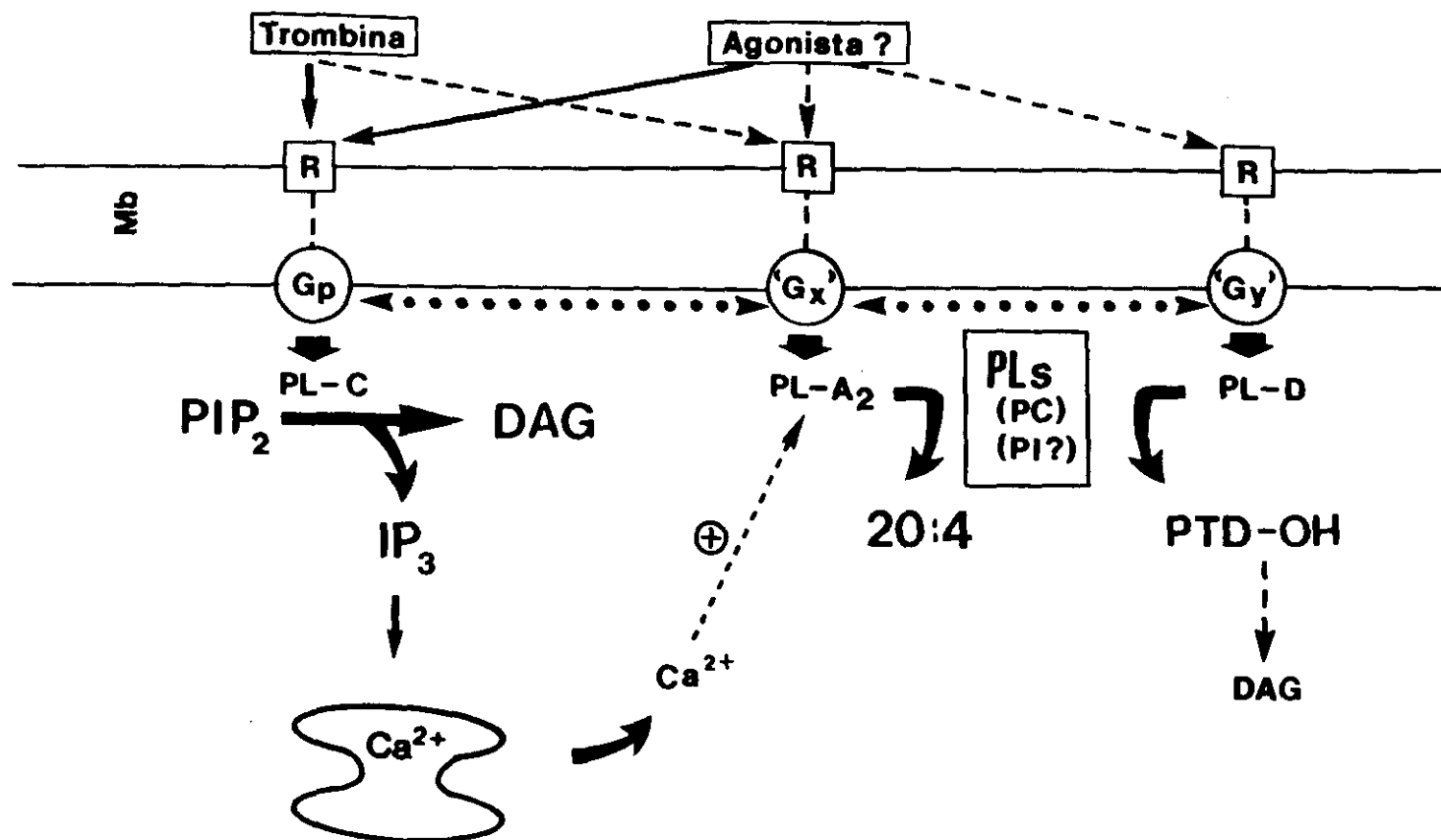


FIG. 13. POSIBLES PROTEINAS-G-REGULADORAS IMPLICADAS EN LA ACTIVACION PLAQUETARIA (Ver texto para más detalles).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.- La presencia de Albúmina de Suero Bovino en el medio de incubación inhibe la hidrólisis de polifosfoinosítidos, la movilización de ácido araquidónico y la secreción de serotonina en plaquetas caninas activadas por trombina ó ionóforo cálcico A23187.
- 2.- La estimulación de plaquetas de perro por trombina se produce a través de un mecanismo independiente de la concentración de calcio extracelular, no descartando la necesidad de movilización o redistribución de almacenes intracelulares de calcio.
- 3.- La Proteína-Quinasa-C modula la secreción plaquetaria de serotonina en el perro.
- 4.- Nuestros resultados sugieren que el ácido araquidónico movilizado durante la activación plaquetaria en el perro, procede mayoritariamente del ataque de una Fosfolipasa-A₂ sobre los principales fosfolípidos de membrana.
- 5.- La secreción de serotonina inducida por trombina en plaquetas caninas es un proceso completamente dependiente de la hidrólisis de polifosfoinosítidos; no obstante, estas plaquetas disponen de rutas alternativas de activación, independientes de la hidrólisis de polifosfoinosítidos y activables por calcio y/o proteínas-G-reguladoras.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Jain,N.C. (1986)
"Schalm's Veterinary Haematology" (4^a ed.)
(Ed. Lea Febiger,Philadelphia)
- 2.- Ettinger,S.J. (1989)
"Textbook of Veterinary Internal Medicine. Diseases of the dog and cat." (3^a ed.);
pags: 2246-2283
(W.B.Saunders Company)
- 3.- Harlan,J.M, Harker,L.A. (1981)
Med.Clin.North.Am. 65: 855-879
- 4.- Ross,R., Glomset,J.A. (1976)
New.Engl.J.Med. 295: 369-377
- 5.- Remuzzi,G., Mecca,G., Marchesi,D., Livio,M., De Gaetano,G., Donati,M.B.,
Silver,M.J. (1979)
Thromb.Res. 16: 345-354
- 6.- Hayslett,J.P. (1984)
New Engl.J.Med. 310: 1457-1458
- 7.- Siess,W. (1989)
Phys.Rev. 69: 58-178
- 8.- Baumgartner,H.R. (1972)
Thromb.Diath.Haemorrh.Suppl. 51:161-176
- 9.- Page,C.P. (1988)
Trends Pharmacol.Sci. 9: 66-71
- 10.- Ruggeri,Z.M., Zimmermann,T.S. (1985)
Semin.Hematol. 22: 203-218
- 11.- Leytin,V.L., Gorbunova,N.A., Misselwitz,F., Novikov,I.D., Podrez,E.A.,
Plyusch,O.P., Likhachova,E.A., Repin,V.S., Smirnov,V.N. (1984)
Thromb.Res. 34: 51-63
- 12.- Bockenstedt,P., Greenberg,J.M., Handin,R.I. (1986)
Blood 77: 743-749
- 13.- Sixma,J.J., Sakariassen,K.S., Stel,H.V., Houdijk,W.P., In der Maur,D.W.,
Hamer,R.J., De Groot,P.G., Van Mourik,J.A. (1984)

- 14.- Fujimura,Y., Titani,K.,Holland,L.Z., Russell,S.R., Roberts,J.R., Elder,J.H., Ruggeri,J.M., Zimmermann,T.S. (1986)
J.Biol.Chem. 261: 381-385
- 15.- Weiss,H.J., Tschopp,T.B., Baumgartner,H.R., Sussman,I.I., Johnson,M.M., Egan,J.J. (1974)
Am.J.Med. 57: 920-925
- 16.- White,J.G. (1988)
"Platelet Membrane Receptors: Molecular Biology, Immunology, Biochemistry and Pathology",
Ed.G.A.Jamieson, pags. 1-32 (Alan R. Liss,Inc. New York)
- 17.- Larrimer,N.R., Balcerzak,S.P., Metz,E.N., Lee,R.E. (1970)
Am.J.Med.Sci. 259: 242-256
- 18.- Meyers,K.M., Hopkins,G., Holmsen,H., Benson,K., Prieur,D.J. (1982)
Am.J.Pathol. 106: 364-377
- 19.- White,J.G. (1974)
Thromb.Diath.Haemorrh. 60: 159-171
- 20.- White,J.G. (1974)
Prog.Haemostasis Thromb. 2: 49-98
- 21.- Carroll,R.C., Butler,R.G., Morris,P.A., Gerrard,J.M. (1982)
Cell 30: 385-393
- 22.- Patscheke,H. (1980)
Thromb.Res. 17: 133-142
- 23.- White,J.G., Rao,G.H., Estensen,R.D. (1974)
Am.J.Pathol. 75: 301-312
- 24.- Kinlough-Rathbone,R.L., Packham,M.A., Reimers,H.J., Cazenave,J.P. Mustard,J.F. (1977)
J.Lab.Clin.Med. 90: 707-719
- 25.- Siess,W., Weber,P.C., Lapetina,E.G. (1984)
J.Biol.Chem. 259: 8286-8292

- 26.- Mc. Millan,D.C. (1966)
Nature 211: 140-144
- 27.- Vargaftig,B.B., Chignard,M., Benveniste,J. (1981)
Biochem.Pharmacol. 30: 263-271
- 28.- Lages,B., Weiss,H.J. (1981)
Thromb.Haemostasis 45: 173-179
- 29.- Peerschke,E.I.B., Zucker,M.B., Grant,R.A., Egan,J.J., Johnson,M.M. (1980)
Blood 55: 841-847
- 30.- Peerschke,E.I.B. (1985)
Semin.Hematol. 22: 241-259
- 31.- Hagen,I., Bjerrum,O.J., Gogstad,G., Korsmo,R., Solum,N.O. (1982)
Biochim.Biophys.Acta 701: 1-6
- 32.- Kunicki,T.J., Pidard,D., Rosa,J.P., Nurden,A.T. (1981)
Blood 58: 268-278
- 33.- Ginsberg,M.H., Lightsey,A., Kunicki,T.J., Kaufmann,A., Marguerie,G., Plow,E.F. (1986)
J.Clin.Invest. 78: 1103-1111
- 34.- Kirchhofer,D., Gailit,J., Ruoslahti,E., Grzesiak,J., Pierschbacher,M.D. (1990)
J.Biol.Chem. 265: 18525-18531
- 35.- Holmsen,H. (1977)
Thromb.Haemostasis 38: 1030-1041
- 36.- Holt,J.C., Niewiarowski,S. (1985)
Semin.Hematol. 22: 151-163
- 37.- Stenberg,P.E., Shuman,M.A., Levine,S.P. (1984)
J.Cell.Biol. 98: 748-760
- 38.- Smith,J.B., Ingberman,C., Kocsis,J.J., Silver,M.J. (1973)
J.Clin.Invest. 52: 965-969
- 39.- Born,G.V.R. (1962)
Nature 194: 927-929

- 40.- O'Brien,J.R. (1962)
J.Clin.Pathol. 15: 446-455
- 41.- Kaplan,K.L., Broekman,M.J., Chernoff,A., Lesznik,G.R., Drillings,M. (1979)
Blood 53: 604-618
- 42.- White,J.G. (1979)
Am.J.Clin.Pathol. 71: 363-378
- 43.- White,J.G., Krumwiede,M. (1987)
Blood 69: 1196-1203
- 44.- Polasek,J., Richardson,M., Moore,M.A. (1987)
Thromb.Res. 45: 771-782
- 45.- Born,G.V.R. (1970)
J.Physiol. 209: 487-511
- 46.- Haslam,R.J. (1973)
Semin.Hematol. 6: 333-350
- 47.- Stormorken,H., Lyberg,T., Kakvaag,L., Nakstad,B. (1987)
Thromb.Res. 45: 363-370
- 48.- Colman,R.W. (1986)
Semin.Hematol. 23: 119-128
- 49.- Cusack,N.J. Hourani,S.M.O. (1982)
Br.J.Pharmacol. 76: 221-227
- 50.- Mills,D.C.B., Figures,W.R., Searce,L.M., Stewart,G.J., Colman,R.F.,
Colman,R.W. (1985)
J.Biol.Chem. 260: 8078-8083
- 51.- Colman,R.W., Puri,R.N., Zhou,F., Colman,R.F. (1988)
"Platelet Membrane Receptors: Molecular Biology, Immunology, Biochemistry and
Pathology", Ed.G.A.Jamieson, pags. 263-277 (Alan R. Liss,Inc. New York)
- 52.- Colman,R.W., Figures,W.R., Searce,L.M., Stimpler,A.M., Zhou,F., Rao,A.K.
(1986)
Blood 68: 565-569
- 53.- Morinelli,T.A., Niewiarowski,S., Kornecki,E., Figures,W.R., Wachtfogel,Y.T.,

Colman,R.W. (1983)
Blood 61: 41-49

- 54.- Figures,W.R., Searce,L.M., Wachtfogel,Y.T., Chen,J., Colman,R.F., Colman,R.W. (1986)
J.Biol.Chem. 261: 5981-5986
- 55.- Colman,R.W., Figures,W.R. (1984)
Mol. and Cell. Biochem. 59: 101-111
- 56.- Figures,W.R., Colman,R.F., Niewiarowski,S., Morinelli,T.A., Wachtfogel,Y.T., Colman,R.W. (1981)
Thromb.Haemostasis. 46: 94-99
- 57.- O'Brien,J.R. (1963)
Nature 200: 763-764
- 58.- Siess,W., Lorenz,R., Roth,P., Weber,P.C. (1982)
Circulation 66: 44-48
- 59.- Ardlie,N.G., Cameron,H.A., Garrett,J. (1984)
Thromb.Res. 36: 315-322
- 60.- Cameron,H.A., Ardlie,N.G. (1982)
Prostaglandins Leukotrienes Med. 9: 117-128
- 61.- Alexander,R.W., Cooper,B., Handin,R.I. (1978)
J.Clin.Invest. 61: 1136-1144
- 62.- Clare,K.A., Scrutton,M.C., Thompson,N.T. (1984)
Br.J.Pharmacol. 82: 467-476
- 63.- Lenox,R.H., Ellis,J., Van Riper,D., Ehrlich,Y.H. (1985)
Mol.Pharmacol. 27: 1-9
- 64.- Lanza,F., Cazenave,J.P. (1985)
Thromb.Haemostasis 54: 402-408
- 65.- Regan,J.W., Nakata,H., Demarinis,R.M., Caron,M.G., Lefkowitz,R.J. (1986)
J.Biol.Chem. 261: 3894-3900
- 66.- Cerione,R.A., Regan,J.W., Nakata,H., Codina,J., Benovic,J.L., Gierschik,P., Somers,R.L., Spiegel,A.M., Birnbaumer,L., Lefkowitz,R.J., Caron,M.G. (1986)

- 67.- Valone,F.H. (1988)
"Platelet Membrane Receptors: Molecular Biology, Immunology, Biochemistry and Pathology", Ed.G.A.Jamieson, pags. 319-340 (Alan R. Liss,Inc. New York)
- 68.- Camussi,G., Aglietta,M., Coda,R., Bussolino,F., Piacibello,W., Tetta,C. (1981)
Immunology 42: 191-199
- 69.- Chignard,M., Le Couedic,J.P., Vargaftig,B.B., Benveniste,J. (1980)
Br.J.Haematol. 46: 455-464
- 70.- Chesney,C.M., Pifer,D.D., Byers,L.W., Muirhead,E.E. (1982)
Blood 59: 582-585
- 71.- Valone,F.H. (1984)
Immunology 52: 169-174
- 72.- Hwang,S.B., Lam,M.H., Pong,S.S. (1986)
J.Biol.Chem. 261: 532-537
- 73.- Lapetina,E.G. (1982)
J.Biol.Chem. 257: 7314-7317
- 74.- MacIntyre,D.E., Pollock,W.K. (1983)
Biochem.J. 212: 433-437
- 75.- Billah,M.M., Lapetina,E.G. (1983)
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80: 965-968
- 76.- Miller,O.V., Ayer,D.E., Gorman,R.R. (1982)
Biochim.Biophys.Acta 711: 445-451
- 77.- Chignard,M., Le Couedic,J.P., Tence,M., Vargaftig,B.B., Benveniste,J. (1979)
Nature 279: 799-800
- 78.- Hornby,E.J., Perry,C.R. (1983)
Thromb.Haemostasis 50: 586-587
- 79.- Klopogge,E., Dehaas,G.H., Gorter,G. (1983)
Thromb.Res. 30: 107-112

- 80.- Michell,R.H., Kirk,C.J., Billah.M.M. (1979)
Biochem.Soc.Trans. 7: 861-865
- 81.- Nabika,T., Velletri,P.A., Lovenberg,N., Beaven,M.A. (1985)
J.Biol.Chem. 260: 4661-4670
- 82.- Kim,J.K., Dillingham,M.A., Summer,S.N., Ishikawa,S., Anderson,R.J.,
Schrier,R.W. (1985)
J.Clin.Invest. 76: 1530-1535
- 83.- Pollock,W.K., Mc.Intyre,D.E. (1986)
Biochem.J. 234: 67-73
- 84.- Thibonnier,M., Roberts,J.M. (1985)
J.Clin.Invest. 76: 1857-1864
- 85.- Thibonnier,M. (1987)
J.Biol.Chem. 262: 10960-10964
- 86.- Brass,L., Manning,D., Woolkalis,M. (1987)
Thromb.Haemostasis. 58: 495-499
- 87.- Nugteren,D.H., Hazelhof,E. (1973)
Biochim.Biophys.Acta 326: 448-461
- 88.- Hamberg,M., Svensson,J., Samuelsson,B. (1975)
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 72: 2994-2998
- 89.- Armstrong,R.A., Jones,R.L., Wilson,N.H. (1983)
Br.J.Pharmacol. 79: 953-964
- 90.- Mais,D.E., Saussy,D.L., Chaikhouni,,A., Kochel,P.J., Knapp,D.R., Hamanaka,N.,
Halushka,P.V. (1985)
J.Pharmacol.Exp.Ther. 233: 418-424
- 91.- Houslay,M.D., Bojanic,D., Wilson,A. (1986)
Biochem.J. 234: 737-740
- 92.- Brass,L.F., Shaller,C.C., Belmonte,E.J. (1987)
J.Clin.Invest. 79: 1269-1275
- 93.- Jaffe,R., Deykin,D. (1974)
J.Clin.Invest. 53: 875-883

- 94.- Santoro,S.A. (1988)
"Platelet Membrane Receptors: Molecular Biology, Immunology, Biochemistry and Pathology", Ed.G.A.Jamieson, pags. 291-314 (Alan R. Liss,Inc. New York)
- 95.- Santoro,S.A. (1986)
Cell 46: 913-920
- 96.- Nieuwenhuis,H.K., Akkerman,W.A., Houdijk,W.P.M., Sixma,J.J. (1985)
Nature 318: 470-472
- 97.- Fenton,J.W. (1981)
Ann.N.Y.Acad.Sci. 370: 468-495
- 98.- Davey,M.G., Lusher,E.F. (1967)
Nature 216: 857-858
- 99.- Detwiler,T.C. (1981)
Ann.N.Y.Acad.Sci. 370: 67-71
- 100.- Berndt,M.C., Gregory,C., Dowden,G., Castaldi,P.A. (1986)
Ann.N.Y.Acad.Sci. 485: 374-387
- 101.- Mc.Gowan,E.B., Detwiler,T.C. (1986)
J.Biol.Chem. 261: 739-746
- 102.- Holmsen,H., Dangelmaier,C.A., Holmsen,A.K. (1981)
J.Biol.Chem. 256: 9393-9396
- 103.- Holmsen,H., Dangelmaier,C.A., Rongved,S. (1984)
Bichem.J. 222: 157-167
- 104.- Tollefsen,D.M., Feagler,J.R., Majerus,P.W. (1974)
J.Biol.Chem. 249: 2646-2651
- 105.- Ganguly,P. (1977)
Br.J.Haematol. 37: 47-51
- 106.- Okumura,T., Hasitz,M., Jamieson,G.A. (1978)
J.Biol.Chem. 253: 3435-3443
- 107.- Takamatsu,J., Horne,M.K., Gralnick,H.R. (1986)
J.Clin.Invest. 77: 362-368

- 108.- Phillips,D.R., Agin,P.P. (1977)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 75: 940-947
- 109.- Berndt,M.C., Phillips,D.R. (1981)
J.Biol.Chem. 256: 59-65
- 110.- Harmon,J.T., Jamieson,G.A (1985)
Biochemistry 24: 58-64
- 111.- Harmon,J.T., Jamieson,G.A (1986)
J.Biol.Chem. 261: 13224-13229
- 112.- Jamieson,G.A. (1988)
"Platelet Membrane Receptors: Molecular Biology, Immunology, Biochemistry and Pathology", Ed.G.A.Jamieson, pags. 137-158 (Alan R. Liss,Inc. New York)
- 113.- Okita,J.R., Pidard,D., Newman,P.J., Montgomery,R.G., Kunicki, T.J. (1985)
J.Cell.Biol. 100: 317-321
- 114.- Fenton,J.W, Bing,D.H. (1986)
Semin.Thromb.Hemostasis 12: 200-208
- 115.- McGowan,E.B., Yeo,K.T., Detwiler,T.C. (1983)
Arch.Biochem.Biophys. 227: 287-301
- 116.- Bienz,D., Schnippering,W., Clemetson,K.J. (1986)
Blood 68: 720-725
- 117.- Golden,A., Nemeth,S.P., Brugge,J.S. (1986)
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83: 852-856
- 118.- Golden,A., Brugge,J.S. (1989)
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 86: 901-905
- 119.- Gilman,A.G. (1987)
Annu.Rev.Biochem. 56: 615-649
- 120.- Gilman,A.G. (1984)
Cell 36: 577-579
- 121.- Godchaux,W.,III., Zimmerman,,W.F. (1979)
J.Biol.Chem. 254: 7874-7884

- 122.- Codina,J., Yatani,A., Grenet,D., Brown,A., Birnbaumer,L. (1987)
Science 236: 442-445
- 123.- Hescheler,J., Rosenthal,W., Trautwein,W., Schultz,G. (1987)
Nature 325: 445-447
- 124.- Jelsema,C. (1987)
J.Biol.Chem. 262: 163-168
- 125.- Burch,R.M., Luini,A., Axelrod,J. (1986)
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 83: 7201-7205
- 126.- Cockcroft,S., Gomperts,B.D. (1985)
Nature 314: 334-336
- 127.- Litosh,I., Fain,J.N. (1986)
Life Sci. 39: 187-194
- 128.- Irving,H., Exton,J. (1987)
J.Biol.Chem. 262: 3440-3443
- 129.- Exton,J.H. (1990)
J.Biol.Chem. 265: 1-4
- 130.- Aktories,K., Jakobs,K.H. (1981)
FEBS Lett. 130: 235-238
- 131.- Grandt,R., Aktories,K., Jakobs,K.H. (1986)
Bichem.J. 237: 669-674
- 132.- Houslay,M.D., Bojanic,D., Gawler,D., O'Hagan,S., Wilson,A. (1986)
Biochem.J. 238: 109-113
- 133.- Haslam,R.J., Davidson,M.M.L., Davies,T., Lynham,J.A., McClenaghan,M.D.
(1978)
Adv.Cyclic Nucleotide Res. 9: 533-552
- 134.- Haslam,R.J., Davidson,M.M.L. (1984)
J.Recept.Res. 4: 605-629
- 135.- Rendu,F., Lebrete,M., Tenza,D., Levy-Toledano,S. (1990)
Biochem.J. 265: 343-349

- 136.- Haslam,R.J., Davidson,M.M.L. (1984)
FEBS Lett. 174: 90-95
- 137.- Baldassare,J.J., Fisher,G.J. (1986)
J.Biol.Chem. 261: 11942-11944
- 138.- Kucera,G.L., Rittenhouse-Simons,S.E. (1988)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 153: 417-421
- 139.- Brass,L.F., Laposata,M., Banga,H.S., Rittenhouse-Simons,S.E. (1986)
J.Biol.Chem. 261: 16838-16847
- 140.- O'Rourke,F., Zavoico,G., Smith,L., Feinstein,M. (1987)
FEBS Lett. 214: 176-180
- 141.- Kienast,J., Arnout,J., Pfliegler,G., Deckmyn,H., Hoet,B., Vermynen,J. (1987)
Blood 69: 859-866
- 142.- Lapetina,E.G. (1986)
Biochim.Biophys.Acta 884: 219-224
- 143.- Lapetina,E.G., Reep,B.R. (1987)
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 84: 2261-2265
- 144.- Singh,H., Simons,E., Brass,L.F., Rittenhouse-Simons,S.E. (1986)
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 83: 9197-9201
- 145.- Oberdisse,E., Lapetina,E.G. (1987)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 144: 1188-1196
- 146.- Crouch,M.F., Lapetina,E.G. (1988)
J.Biol.Chem. 263: 3363-3371
- 147.- Michell,R.H. (1975)
Biochim.Biophys.Acta 415: 81-147
- 148.- Rittenhouse-Simons,S.E. (1983)
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 80: 5417-5420
- 149.- Chau,L.Y., Tai,H.H. (1982)
Biochim.Biophys.Acta 713: 344-351

- 150.- Banno,Y., Nakashima,S., Tomatsu,T., Nozawa,Y., Lapetina,E.G. (1986)
Bichem.Biophys.Res.Comm. 140: 728-734
- 151.- Deckmyn,H., Tu,S.M., Majerus,P. (1986)
J.Biol.Chem. 261: 16553-16558
- 152.- Billah,M.M., Lapetina,E.G. (1982)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 109: 217-222
- 153.- Nakamura,K., Kambayashi,J., Suga,K., Hakata,H., Mori,T. (1985)
Thromb.Res. 38: 513-525
- 154.- Simon,M-F., Chap,H., Douste-Blazy,L. (1984)
FEBS Lett 170: 43-48
- 155.- Putney,J.W.Jr. (1982)
Cell Calcium. 3: 369-383
- 156.- Seyfred,M.A., Wells,W. (1984)
J.Biol.Chem. 259: 7666-7672
- 157.- Vincentini,L., Villereal,M. (1984)
Biochem.Biophys.Res.Comm.123: 663-670
- 158.- Bone,E.A., Fretten,P., Palmer,S., Kirk,C.J., Michell,R.H. (1984)
Biochem.J. 221: 803-811
- 159.- Volpi,M., Yassin,R.,Naccache,P.H., Sha'Afi,R.I. (1983)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 112: 957-964
- 160.- Axen,K.V., Schubert,U.K., Blake,A.D., Fleischer,N. (1983)
J.Clin.Invest. 72: 13-21
- 161.- Fisher,S.K., Agranoff,B.W. (1981)
J.Neurochem. 37: 968-977
- 162.- Akhtar,R.A., AbdelLatif,A.A. (1980)
Biochem.J. 142: 599-604
- 163.- Majerus,P.W., Neufeld,E.J., Wilson,D.B. (1984)
Cell 37: 701-703
- 164.- Kolesnick,R.N., Gerschengorn,M.C. (1981)

J.Neurochem. 37: 968-977

- 165.- Rittenhouse-Simons,S. (1981)
J.Biol.Chem. 256: 4153-4155
- 166.- Lapetina,E.G., Reep,B.R., Watson,S.P. (1986)
Life Sci. 39: 751-759
- 167.- Wilson,D., Bross,T., Hofman,S., Majerus,P. (1984)
J.Biol.Chem. 259: 11718-11724
- 168.- Holub,B.J., Cell,B. (1984)
Can.J.Biochem.Cell.Biol. 62: 115-120
- 169.- Mahadevappa,V.G., Holub,B.J. (1983)
J.Biol.Chem. 258: 5337-5339
- 170.- Muller,E., Hegewald,H., Jaroszewicz,K., Cumme,G.A., Hoppe,H., Frunder,H. (1986)
Biochem.J. 235: 775-783
- 171.- Chap,H., Perret,B., Plantavid,M., Lachachi,H., Douste- Blazy,L. (1987)
"Platelets in Biology and Pathology III" Ed. D.E.McIntyre, J.L.Gordon; pages.: 191-204 (Elsevier,Amsterdam)
- 172.- Bell,R.L., Majerus,P.W. (1980)
J.Biol.Chem. 255: 1790-1792
- 173.- Mauco,G., Dangelmaier,C.A., Smith,J.B. (1984)
Biochem.J. 224: 933-940
- 174.- Leung,N.L., Kinlough-Rathbone,R.L., Mustard,J.F. (1977)
Br.J.Haematol. 36: 417-425
- 175.- Downes,C., Michell,R.H. (1982)
Cell Calcium 3: 467-502
- 176.- Stephens,L., Hawkins,P.T., Downes,C.P. (1989)
Biochem.J. 259: 267-276
- 177.- Nolan,R.D., Lapetina,E.G. (1990)
J.Biol.Chem. 265: 2441-2445

- 178.- Hokin,L.E. (1985)
Ann.Rev.Biochem. 54: 205-235
- 179.- Rana,R.S., Hokin,L.E. (1990)
Physiol.Rev. 70: 115-164
- 180.- Lloyd,J.V., Nishizawa,E.E., Haldar,J., Mustard,J.F. (1972)
Br.J.Haematol. 23: 571-585
- 181.- Lloyd,J.V., Mustard,J.F. (1974)
Br.J.Haematol. 26: 243-253
- 182.- Rittenhouse-Simmons,S. (1979)
J.Clin.Invest. 63: 580-587
- 183.- Bell,R.L., Majerus,P.W. (1980)
J.Biol.Chem. 255: 1790-1792
- 184.- Mauco,G., Chap,H., Douste-Blazy,L. (1979)
FEBS Lett. 100: 367-370
- 185.- Call,F.L., Williams,W.J. (1970)
J.Clin.Invest. 49: 392-399
- 186.- Lucas,C.T., Call,F.L., Williams,W.J. (1970)
J.Clin.Invest. 49: 1949-1955
- 187.- Agranoff,B.W., Murphy,P., Seguin,E.B. (1983)
J.Biol.Chem. 258: 2076-2078
- 188.- Billah,M.M., Lapetina,E.G. (1982)
J.Biol.Chem. 257: 12705-12708
- 189.- Michell,R.K., Kirk,C.J. (1981)
Trends.Pharmacol.Sci. 2: 86-89
- 190.- Kemp,P., Hubscher,G., Hawthorne,J.N. (1961)
Biochim.Biophys.Acta 31: 585-586
- 191.- Thompson,W., Dawson,R.M.C. (1964)
Biochem.J. 91:237-243
- 192.- Siess,W., Binder,H. (1985)

- 193.- Vickers,J.D., Kinlough-Rathbone,R.L., Mustard,J.F. (1984)
Biochem.J. 224: 399-405
- 194.- Watson,S.P., McConnell,R.T., Lapetina,E.G. (1984)
J.Biol.Chem. 259: 13109-13203
- 195.- Binder,H., Weber,P.C., Siess,W. (1985)
Anal.Biochem. 148: 220-227
- 196.- Ishii,H., Connolly,T.M., Bross,T.E., Majerus,P.W. (1986)
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 83: 6397-6341
- 197.- Daniel,J.L., Dangelmaier,C.A., Smith,J.B. (1987)
Biochem.J. 246: 109-114
- 198.- Dixon,J.F., Hokin,L.E., (1987)
J.Biol.Chem. 262: 13892-13895
- 199.- Connolly,T.M., Bross,T.E., Majerus,P.W. (1985)
J.Biol.Chem. 260: 7868-7874
- 200.- Connolly,T.M., Bansai,V.S., Bross,T.E., Irvine,R.F., Majerus,P.W. (1987)
J.Biol.Chem. 262: 2146-2149
- 201.- Connolly,T.M., Wilson,D.B., Bross,T.E., Majerus,P.W. (1986)
J.Biol.Chem. 261: 122-126
- 202.- Lapetina,E.G. (1988)
"Platelet Membrane Receptors: Molecular Biology, Immunology, Biochemistry and Pathology", Ed.G.A.Jamieson, pages. 499-511 (Alan R. Liss,Inc. New York)
- 203.- Irvine,R.F., Letcher,A.J., Heslop,J.P., Berridge,M.J. (1986)
Nature 320: 631-634
- 204.- Nishizuka,Y. (1984)
Nature 308: 693-698
- 205.- Bell,R.L., Kennerly,D.A., Stanford,N., Majerus,P.W. (1979)
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 76: 3238-3241
- 206.- Majerus,P.W., Wilson,D.B., Connolly,T.M., Bross,T.E., Neufeld,E.J. (1985)

- 207.- Billah,M.M., Lapetina,E.G., Cuatrecasas,P. (1979)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 90: 92-98
- 208.- Broekman,M.J., Ward,J.W., Marcus,A.J. (1981)
J.Biol.Chem. 256: 8271-8274
- 209.- Siess,W., Siegel,F.L., Lapetina,E.G. (1983)
J.Biol.Chem. 258: 11236-11242
- 210.- Lapetina,E.G., Silio,J., Ruggiero,M. (1985)
J.Biol.Chem. 260: 7078-7083
- 211.- Moscat,J., Moreno,F., Iglesias,S., García-Barreno,P., Municio,A.M. (1986)
Biochem.J. 238: 709-714
- 212.- Michell,R.H. (1975)
Biochim.Biophys.Acta 415: 81-147
- 213.- Fain,J.N., Berridge,M.J. (1979)
Biochem.J. 178: 45-58
- 214.- Berridge,M.J. (1987)
Ann.Rev. Biochem. 56: 159-193
- 215.- O'Rourke,F.A., Halenda,S.P., Zavoico,G.B., Feinstein,M.B. (1985)
J.Biol.Chem. 260: 956-962
- 216.- Watson,S.P., Ruggiero,M., Abrahams,S.L., Lapetina,E.G. (1986)
J.Biol.Chem. 261: 5368-5372
- 217.- Authi,K.S., Crawford,N. (1985)
Biochem.J. 230: 247-253
- 218.- Brass,L.F., Joseph,S.K. (1985)
J.Biol.Chem. 260: 15172-15179
- 219.- Enouf,J., Girard,F., Bredoux,R., Bourdean,N., Levy-Toledano,S. (1987)
Biochim.Biophys.Acta 928: 76-82
- 220.- Tarver,A., King,W.F., Rittenhouse,S.E. (1987)
J.Biol.Chem. 262: 17268-17271

- 221.- Burgess,G.M., Irvine,R.F., Berridge,M.J.,McKinney,J.S., Putney,J.W. (1984)
Biochem.J. 224: 741-746
- 222.- Irvine,R.F., Brown,K.D., Berridge,M.J. (1984)
Biochem.J. 221: 269-272
- 223.- Lee,C.H., Hokin,L.E. (1989)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 159: 561-565
- 224.- Wilson,D.B., Connolly,T.M., Bross,T.E., Majerus,P.W., Sherman,W.R.,
Tyler,A.N., Rubin,L.J., Brown,J.E. (1985)
J.Biol.Chem. 260: 13496-13501
- 225.- Irvine,R.F., Moor,R.M. (1986)
Biochem.J. 240: 917-920
- 226.- Rengasamy,A., Feinberg,H. (1988)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 150: 1021-1026
- 227.- Spät,A., Bradford,P.G., McKinney,J.S., Rubin,R.P., Putney,J.W. (1986)
Nature 319: 514-516
- 228.- Spät,A., Fabiato,A., Rubin,R.P. (1986)
Biochem.J. 233: 1530-1534
- 229.- Suttepone,S.P., Worley,P.F., Baraban,J.M., Snyder,S.H. (1988)
J.Biol.Chem. 263: 1530-1534
- 230.- Ross,C.A., Meldolesi,J., Milner,T.A., Satoh,T., Supattapone,S., Snyder,S. (1989)
Nature 339: 468-470
- 231.- Brass,L.F., Joseph,S.K. (1985)
J.Biol.Chem. 260: 15172-15179
- 232.- Joseph,S.K., Williamson,J.R. (1986)
J.Biol.Chem. 261:14658-14664
- 233.- Muallem,S., Schoeffield,M., Pandol,S., Sachs,G. (1985)
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:4433-4437
- 234.- Ehrlich,B.E., Watras,J. (1988)
Nature 336: 583-586

- 235.- Berridge,M.J., Irvine,R.F. (1989)
Nature 341: 197-204
- 236.- Prentki,M., Janjic,D., Biden,T.J., Blondel,B., Wollheim,C.B. (1984)
J.Biol.Chem.259:10118-10123
- 237.- Delfert,D.M., Hill,S., Pershadsingh,H.A., Sherman,W.R., McDonald,J.M. (1986)
Biochem.J. 236:37-44
- 238.- Henne,V., Soling,H.D. (1986)
FEBS lett. 202:267-273
- 239.- Thevenod,F. (1989)
J.Membrane.Biol. 109: 173-186
- 240.- Bond,M., Kitazawa,T., Somlyo,A.P., Somlyo,A.V. (1984)
J.Physiol.Lond. 355: 677-695
- 241.- Busa,W.B., Ferguson,J.E., Joseph,S.K., Williamson,J.R., Nuccitelli,R. (1985)
J.Cell.Biol. 101: 677-682
- 242.- Payne,R., Fein,A. (1987)
J.Cell.Biol. 104: 933-937
- 243.- Guillemette,G., Balla,T., Baukal,A.J., Catt,K.J. (1988)
J.Biol.Chem. 263: 4541-4548
- 244.- Volpe,P., Krause,K., Hashimoto,S., Zorzato,F., Pozzan,T., Meldolesi,J., Lewi,D.P. (1988)
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 85: 1091-1095
- 245.- Dean,W.C., Adunyah,S.E. (1986)
J.Biol.Chem. 261:13071-13075
- 246.- Fisher,G.J., Bakshian,S., Baldassare,J.J. (1985)
Biochim.Biophys.Res.Comm.129:958-964
- 247.- Hallam,T.J., Rink,T.J. (1985)
J.Physiol. 368:131-146
- 248.- Authi,K.S., Evenden,B.J., Crawford,N. (1986)
Biochem.J. 233: 709-718

- 249.- Israelis,S.J., Gerrard,J.M. (1985)
Thromb.Res. 40: 499-509
- 250.- Dawson,R.M.C., Irvine,R.F., Bray,J., Quinn,P.J. (1984)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 125: 836-842
- 251.- Dawson,R.M.C., Hemington,N.L., Irvine,R.F. (1983)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 117: 196-201
- 252.- Serhan,C., Anderson,P., Goodman,E., Dunham,P., Weissmann,G. (1981)
J.Biol.Chem. 256: 2736-2741
- 253.- Ohsako,S., Deguchi,T. (1981)
J.Biol.Chem. 256: 10945-10948
- 254.- Brass,L.F., Laposata,M. (1987)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 142: 7-14
- 255.- Holmes,R.P., Yoss,N.L. (1983)
Nature 305: 637-638
- 256.- Sundler,R., Papahadjopoulos,D. (1981)
Biochem.Biophys.Acta 649: 743-750
- 257.- Sundler,R., Düzgünes,N., Papahadjopoulos,D. (1981)
Biochem.Biophys.Acta 649: 751-758
- 258.- Benton,A.M., Gerrard,J.M., Michiel,T., Kindom,S.E. (1982)
Blood 60: 642-649
- 259.- Vigdahl,R.L., Marquis,N.R., Tavormina,P.A. (1969)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 37: 409-415
- 260.- Robison,G.A., Arnold,A., Hartman,R.C. (1969)
Pharmacol.Res.Comm. 1: 325-332
- 261.- DiMinno, G., Silver,M., De Gaetano G.; (1979)
Br. J. Hematol 43:637- 640
- 262.- Booyse,F.M., Marr,J., Yang,D.C., Guiliani,D., Rafelson,M.E. (1976)
Biochim.Biophys.Acta 422: 60-72
- 263.- Fox,J.E.B., Reynolds,C.C., Johnson,M.M. (1987)

J.Biol.Chem. 262: 12627-12631

- 264.- Käser-Glanzman,R., Gerber,E., Lüscher,E.F. (1979)
Biochim.Biophys.Acta 558: 344-347
- 265.- Fujimoto,T., Ohara,S., Hawiger,J. (1982)
J.Clin.Invest. 69: 1212-1222
- 266.- Hawiger,J., Parkinson,S., Timmons,S. (1980)
Nature 283: 195-197
- 267.- Siess,W., Lapetina,E.G. (1983)
Biochim.Biophys.Acta 752: 329-338
- 268.- Lapetina,E.G. (1986)
FEBS Lett. 195: 111-114
- 269.- Cox,A.C., Carroll,R.C., White,J.G., Rao,G.H.R. (1984)
J.Cell.Biol.98: 8-15
- 270.- Feinstein,M.B., Egan,J.J., Opas,E.E. (1983)
J.Biol.Chem. 258: 1260-1267
- 271.- Fox,J.E.B., Phillips,D.R. (1982)
J.Biol.Chem. 257: 4120-4126
- 272.- Feinstein,M.B., Egan,J.J., Sha'afi,R.I., White,J. (1983)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 113: 598-604
- 273.- Thompson,N.T., Scrutton,M.C. (1985)
Eur.J.Biochem. 147: 421-427
- 274.- Enouf,J., Giraud,F., Bredoux,R., Bourdeaux,N., Levy-Toledano,S. (1987)
Biochim.Biophys.Acta 928: 76-82
- 275.- Käser-Glanzman,R., Jakabova,M., George,J.N., Lüscher,E.F. (1977)
Biochim.Biophys.Acta 466: 429-440
- 276.- Le Peuch,C.J., Le Peuch,D.A.M., Katz,S., Demaille,J.G., Hincke,M.T., Bredoux,R.,
Enouf,J., Levy-Toledano,S., Caen,J. (1983)
Biochim.Biophys.Acta 731: 456-464
- 277.- Fisher,T.H., White,G.C. (1987)

- 278.- Lerea K., Glomset J., Krebs,E. (1987)
J.Biol.Chem. 262: 282-288
- 279.- Rink, T.J. (1990)
Annu.Rev.Physiol. 52:431-449
- 280.- Rink,T.J., Smith,S.W., Tsien,R.Y. (1982)
FEBS Lett. 148: 21-26
- 281.- Doyle,V.M., Rüegg,U.T. (1985)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 127: 161-167
- 282.- Sage,S.O., Rink,T.J. (1986)
Eur.J.Pharm. 128:99-107
- 283.- Hallam,T.J., Rink,T.J. (1989)
Trends.Pharm.Sci. 10:8-10
- 284.- Mahaut-Smith,M.P., Rink, T.J., Sage, S.O. (1989)
J.Physiol. 415:24P
- 285.- Sage,,S.O., Rink,T.J. (1987)
J.Biol.Chem. 262:16364-16369
- 286.- Sage,S.O., Merritt, J.E., Hallam, T.J., Rink, T.J. (1989)
Biochem.J. 258:923-926
- 287.- Adunyah,S.E., Dean,W.L. (1985)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 128: 1274-1280
- 288.- Dean,W.L., Sullivan,D.M. (1982)
J.Biol.Chem. 257: 14390- 14394
- 289.- Billah,M.M., Lapetina,E.G., Cuatrecasas,P. (1980)
J.Biol.Chem. 255: 10227-10231
- 290.- Dabrowska,R., Hartshorne,D.J. (1978)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 85: 1352-1359
- 291.- Fox,J.E.B., Reynolds,C.C., Phillips,D.R. (1983)
J.Biol.Chem. 258: 9973-9981

- 292.- Yoshida,N., Weksler,B., Nachman,R. (1983)
J.Biol.Chem. 258: 7168-7174
- 293.- Rink.T.J., Sanchez,A., Hallam,T.J. (1983)
Nature 305: 317-319
- 294.- Feinstein,M.B. (1980)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 93: 593-600
- 295.- Knight,D.E., Hallam,T.J., Scrutton.M.C. (1982)
Nature 296: 256-257
- 296.- Haslam,R.J., Davidson,M.M.L. (1984)
Biochem.J. 22: 351-361
- 297.- Knight,D.E., Scrutton,M.C. (1985)
FEBS Lett. 183: 417-422
- 298.- Knight,D.E., Scrutton.M.C. (1986)
Eur.J.Biochem. 160: 183-190
- 299.- Takai,Y., Kishimoto,A., Iwasa,Y., Kawahara,Y., Mori,T., Nishizuka,Y. (1979)
J.Biol.Chem. 254: 3692-3695
- 300.- Nishizuka,Y. (1988)
Nature 334: 661-665
- 301.- Kawahara,Y., Takai,Y., Minakuchi,R., Sano,K., Nishizuka,Y. (1980)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 97: 309-317
- 302.- Ganong,B.R., Loomis,C.R., Hannun,Y.A. (1986)
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 83: 1184-1188
- 303.- Takai,Y., Kishimoto,A., Iwasa,Y., Kikkawa,U., Mori,T., Nishizuka,Y. (1979)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 91: 1218-1224
- 304.- Siess,W., Lapetina,E.G. (1988)
Biochem.J. 255: 309-318
- 305.- Lapetina,E.G., Reep,B., Ganong,B.R., Bell,R.M. (1985)
J.Biol.Chem. 260: 1358-1361

- 306.- Tapley,P.M., Murray,A.W. (1984)
Biochem.Biophys.Res.Communic. 122: 158-164
- 307.- Wolf.M., Levine,H., May,W.S., Cuatrecasas,P., Sahyon,N. (1985)
Nature 317: 546-549
- 308.- Nishizuka,Y. (1986)
Science Wash.DC. 233: 305-312
- 309.- Lyons,R.M., Atherton,R.M. (1979)
Biochemistry 18: 544-552
- 310.- Imaoka,T., Lynham,J.A., Haslam,R.J. (1983)
J.Biol.Chem. 258: 11404-11414
- 311.- Touqui,L., Rothhut,B., Shaw,A.M., Fradin,A., Vargaftig,B.B., Russo-Marie,F. (1986)
Nature 321: 177-180
- 312.- Connolly,T.M., Lawning,W.J., Majerus,P.W. (1986)
Cell 46: 951-958
- 313.- Crouch,M.F., Lapetina,E.G. (1986)
Biochem.Biophys.Res.Communic. 141: 459-465
- 314.- Molina y Vedia,L., Lapetina,E.G. (1986)
J.Biol.Chem. 261: 10493-10495
- 315.- Kaibuchi,K., Takai,Y., Sawamura,M., Hoshijima,M., Fujikura,Y., Nishizuka,Y. (1983)
J.Biol.Chem. 258: 6701-6704
- 316.- Halenda,S.P., Zavoico,G.B., Feinstein,M.B. (1985)
J.Biol.Chem. 260: 12484-12491
- 317.- Morley,A., Tai,H.H. (1985)
Biochem.Biophys.Res.Communic. 130: 717-723
- 318.- Hannun,Y.A., Greenberg,C.S., Bell,R.M. (1987)
J.Biol.Chem. 262: 13620-13626
- 319.- Watson,S.P., McNally,J., Shipman,L.J., Godfrey,P.P. (1988)
Biochem.J. 249: 345-350

- 320.- Yamada,K., Iwahashi,K., Kase,H. (1987)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 144: 35-40
- 321.- Siess,W., Lapetina,E.G. (1987)
Blood 70: 1373-1381
- 322.- Zucker,M.B., Troll,W., Belman,S. (1974)
J.Cell.Biol. 60: 325-336
- 323.- Siffert,W., Siffert,G., Scheid,P. (1987)
Biochem.J. 241: 301-303
- 324.- Krishnamurthi,S., Joseph,S.K., Kakkar,V.V. (1986)
Biochem.J. 238: 193-199
- 325.- Rittenhouse,S.E., Sasson,J.P. (1985)
J.Biol.Chem. 260: 8657-8660
- 326.- Watson,S.P., Lapetina,E.G. (1985)
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 82: 2623-2626
- 327.- Zavoico,G.B., Halenda,S.P., Sha'afi,R.I., Feinstein,M.B. (1985)
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 82: 3859-3862
- 328.- McIntyre,D.E., McNicol,A., Drummond,A.H. (1985)
FEBS Lett. 180: 160-164
- 329.- Poll,C., Westwick,J. (1986)
Biochim.Biophys.Acta 886: 434-440
- 330.- Jakobs,K., Bauer,S., Watanabe,Y. (1985)
Eur.J.Biochem. 151: 425-430
- 331.- Smith,C., Ushing,R., Snyderman,R. (1987)
J.Biol.Chem. 262: 6121-6127
- 332.- Halenda,S.O., Volpi,M., Zavoico,G.B., Sha'afi,R.I., Feinstein,M.B. (1986)
FEBS lett. 204: 341-346
- 333.- Katada,T., Gilman,A., Watanabe,Y., Bauer,S., Jakobs,K. (1985)
Eur.J.Biochem. 151: 431-437
- 334.- Sane,D.C., Bielawska,A., Greenberg,C.S., Hannun,Y.A. (1989)

- 335.- Adelstein,R.S. (1983)
J.Clin.Invest. 72: 1863-1866
- 336.- Daniel,J.L., Molish,I.R., Holmsen,H. (1981)
J.Biol.Chem. 256: 7510-7514
- 337.- Daniel,J.L., Molish,I.R., Rigmaiden,M., Stewart,G. (1984)
J.Biol.Chem. 259: 9826-9831
- 338.- Daniel,J.L., Adelstein,R.S. (1976)
Biochemistry 15: 2370-2377
- 339.- Hathaway,D.R., Adelstein,R.S. (1979)
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 76: 1653-1657
- 340.- Ikebe,M., Hartshorne,D.J. (1985)
J.Biol.Chem. 260: 10027-10031
- 341.- Ikebe,M., Hartshorne,D.J., Elzinga,M. (1986)
J.Biol.Chem. 261: 36-39
- 342.- Adelstein,R.S., Conti,M.A. (1975)
Nature 256: 597-598
- 343.- Scholey,J.M., Taylor,K.A., Kendrick-Jones,J. (1980)
Nature 287: 233-235
- 344.- Nachmias,V.T., Kavalier,J., Jacobowitz,S. (1985)
Nature 313: 70-72
- 345.- Lebowitz,E.A., Cooke,R. (1978)
J.Biol.Chem. 253: 5443-5447
- 346.- Lyons,R.M., Shaw,J.O. (1980)
J.Clin.Invest. 65: 242-255
- 347.- Nuñez,D., Levy-Toledano,S. (1984)
Thromb.Haemostasis 51: 198-203
- 348.- Mannherz,H.G., Goody,R.S. (1976)
Annu.Rev.Biochem. 45: 427-465

- 349.- Jennings,L.K., Fox,J.E.B., Edwards,H.H., Phillips,D.R. (1981)
J.Biol.Chem. 256: 6927-6932
- 350.- Mürer,E.H., Stewart,G.J., Rausch,M.A., Day,H.H. (1975)
Thromb.Diath.Haemorrh. 34: 72-82
- 351.- Feinman,D.R., Detwiler,T.C. (1974)
Nature 249: 172-173
- 352.- Massini,P., Naf,H. (1980)
Biochim.Biophys.Acta 598: 575-587
- 353.- Pollock,W.K., Rink,T.J. (1986)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 139: 308-314
- 354.- Imai,A., Nozawa,Y. (1982)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 105: 236-243
- 355.- Watson,S.P., Wolf,M., Lapetina,E.G. (1985)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 132: 555-562
- 356.- Rittenhouse,S.E. (1984)
Biochem.J. 222: 103-110
- 357.- Lapetina,E.G., Chandrabose,K.A., Cuatrecasas,P. (1978)
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 75: 818-822
- 358.- Billah,M.M., Lapetina,E.G. (1982)
J.Biol.Chem. 257: 5196-5200
- 359.- Smith,J.B., Willis,A.L. (1971)
Nature 231: 235-237
- 360.- Piper,P., Vane,J. (1971)
Ann.N.Y.Acad.Sci. 180: 363-385
- 361.- Lands,W.E.M., Samuelson,B. (1968)
Biochim.Biophys.Acta 164: 426-429
- 362.- Neufeld,E.J., Majerus,P.W. (1983)
J.Biol.Chem. 258: 2461-2467
- 363.- Rittenhouse-Simmons,S., Deykin,D. (1981)

"Platelets in Biology and Pathology II" Ed. J.L.Gordon; pags.: 349-372 (Elsevier, North-Holland,Amsterdam)

- 364.- Marcus,A.J., Ullman,H.L., Safier,L.B. (1969)
J.Lipid.Res. 10: 108-114
- 365.- Cohen,P., Derksen,A. (1969)
Br.J.Haematol. 17: 359-371
- 366.- Lagarde,N., Guichardant,N., Menashi,A.S., Crawford,N. (1982)
J.Biol.Chem. 257: 3100-3104
- 367.- Lagarde,N., Menashi,A.S., Crawford,N. (1981)
FEBS Lett. 124: 23-26
- 368.- Prescott,S.M., Majerus,P.W. (1983)
J.Biol.Chem. 258: 764-769
- 369.- Mauco,G., Fauvel,J., Chap,H., Douste-Blazy,L (1984)
Biochim.Biophys.Acta 796: 169-177
- 370.- Rittenhouse-Simmons,S. (1980)
J.Biol.Chem. 255: 2259-2262
- 371.- Sutherland,C.A., Amin,D. (1982)
J.Biol.Chem. 257: 14006-14010
- 372.- Chau,L.Y., Tai,H.H., (1983)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 113: 241-247
- 373.- McKean,M.L., Smith,J.B., Silver,M.J. (1981)
J.Biol.Chem. 256: 1522-1524
- 374.- Broekman,M.J., Ward,J.W., Marcus,A.J. (1980)
J.Clin.Invest. 66: 275-283
- 375.- Kannagi,R., Koizumi,K., Masuda,T. (1981)
J.Biol.Chem. 256: 1177-1184
- 376.- Loeb,L., Gross,R. (1986)
J.Biol.Chem. 261: 10467-10470
- 377.- Zavoico,G., Gragoe,E., Feinstein,M. (1986)

J.Biol.Chem. 261: 13160-13167

- 378.- Sweatt,J., Johnson,S., Cragoe,E., Limbird,L. (1985)
J.Biol.Chem. 260: 12910-12919
- 379.- Sweatt,J., Blair,I., Cragoe,E., Limbird,L. (1986)
J.Biol.Chem. 261: 8660-8667
- 380.- Sweatt,J., Connolly,T., Cragoe,E., Limbird,L. (1986)
J.Biol.Chem. 261: 8667-8673
- 381.- Ballou,L., Cheung,W.Y. (1983)
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 80: 5203-5207
- 382.- Khanna,N., Tokuda,M., Waisman,D. (1986)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 141: 547-554
- 383.- Murayama,T., Ui,M. (1985)
J.Biol.Chem. 260: 7226-7233
- 384.- Burch,R., Luini,A., Axelrod,J. (1986)
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 83: 7201-7205
- 385.- Jelsema,C., Axelrod,j. (1987)
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 84: 3623-3627
- 386.- Nakashima,S., Tohmatsu,T., Hattori,H., Suganuma,A., Nozawa,Y. (1987)
J.Biochem. 101: 1055-1058
- 387.- Fuse,I., Tai,H.H. (1987)
Biochem.Biophys.Res Commun. 146: 659-665
- 388.- Lapetina,E.G., Cuatrecasas,P. (1979)
Biochim.Biophys.Acta 573: 394-402
- 389.- Lapetina,E.G., Billah,M.M., Cuatrecasas,P. (1981)
J.Biol.Chem. 256: 5037-5040
- 390.- Gerrard,J.M., White,J.G., Rao,G.H.R., Townsend,D. (1976)
Am.J.Pathol. 83: 283-298
- 391.- Aharony,D., Smith,J.B., Silver,M.J. (1982)
Biochim.Biophys.Acta 718: 193-200

- 392.- Croset,M., Lagarde,M. (1983)
Biochem.Biophys.Res Commun. 112: 878-883
- 393.- Siegel,M.I., McConnell,R.T., Abrahams,S.L., Porter,N.A., Cuatrecasas,P. (1979)
Biochem.Biophys.Res Commun. 89: 1273-1280
- 394.- Sautebin,L., Caruso,D., Galli,G., Paoletti,R. (1983)
FEBS Lett. 157: 173-178
- 395.- Samuelsson,B. (1979)
Harvey.Lect. 75: 1-40
- 396.- Moncada,S., Vane,J.R. (1979)
N.Engl.J.Med. 300: 1142-1147
- 397.- Bunting,S.R., Gryglewski,S., Moncada,S., Vane,J.R (1976)
Prostaglandins 12: 897-913
- 398.- Marcus,A.J., Weckslar,B.B., Jaffe,E.A., Broekman,M.J. (1980)
J.Clin.Invest. 66: 979-986
- 399.- Schafer,A.I., Crawford,D.D., Gimbrone,M.A. (1984)
J.Clin.Invest. 73: 1105-1112
- 400.- Ferreira,S.H., Vane,J.R. (1967)
Nature 216: 868-873
- 401.- Moncada,S., Gryglewski,S., Bunting,S., Vane,J.R. (1976)
Nature 163: 663-665
- 402.- Adelman,B., Stemerman,M.B., Mennell,D., Hardin,R.I. (1981)
Blood 58: 198-205
- 403.- Miller,O.V., Gorman,R.R. (1979)
J.Pharmacol.Exp-Ther. 210: 134-140
- 404.- McIntyre,D.E. (1981)
"Platelets in Biology and Pathology II" Ed. J.L.Gordon; pags.: 211-247 (Elsevier,
North-Holland,Amsterdam)
- 405.- Miller,O.V., Gorman,R.R. (1976)
J.Cyclic.Nucleotide Res. 2: 79-87

- 406.- Rybicki,J.P., Venton,D.L., Le Breton,G.C. (1983)
Biochim.Biophys.Acta 751: 66-73
- 407.- Siess,W., Cuatrecasas,P., Lapetina,E.G. (1983)
J.Biol.Chem. 258: 4683-4686
- 408.- Rittenhouse,S.E., Allen,C.L. (1982)
J.Clin.Invest. 70 :1216-1224
- 409.- Huang,E.M., Detwiler,T.C. (1980)
J.Lab.Clin.Med. 95: 59-68
- 410.- Cattaneo,M., Randi,A.M., Canciani,M.T., Lecchi,A., Mannuci,P.M. (1988)
"Platelet Membrane Receptors: Molecular Biology, Immunology, Biochemistry and Pathology", Ed.G.A.Jamieson, pags. 279-283 (Alan R. Liss,Inc. New York)
- 411.- Sturk,A., Asyee,G.M., Schaap,M.C.L., Van Maanen,M., Tencate,J.W (1985)
Thromb.Res. 40: 359-372
- 412.- Siess,W., Böhlig,B., Weber.P.C., Lapetina,E.G. (1985)
Blood 65: 1141-1148
- 413.- Watson,S.P., Reep,B., McConnell,R.T., Lapetina,E.G. (1985)
Biochem.J. 226: 831-837
- 414.- Ware,J.A., Smith,M., Salzman,E.W. (1987)
J.Clin.Invest. 80: 267-271
- 415.- Altman,R., Scazzioti,A. (1986)
Thromb.Res. 43: 113-120
- 416.- De Chaffoy de Courcelles,D., Roevens,P., Van Belle,H., De Clerk,F. (1987)
FEBS Lett. 219: 283-288
- 417.- Steen,V.M., Holmsen,H. (1985)
Thromb.Haemostasis 54: 680-683
- 418.- Ardlie,N.G., Bell,L.K., McGuinness,J.A. (1987)
Thromb.Res. 46: 519-526
- 419.- Bushfield,M., McNicol,A., McIntyre,D.E. (1987)
Biochem.J. 241: 671-676

- 420.- Raaflaub,J. (1956)
Methods.Biochem.Anal. 3: 301-305
- 421.- Z.Klin.Chem.u.Klin.Biochem. 10: 182-186 (1972)
- 422.- Bligh,D., Dyer,W. (1959)
Can.J.Biochem.Physiol. 37: 30-39
- 423.- Roldán,E.R.S., Harrison,R.A.P. (1989)
Biochem.J. 259: 397-406
- 424.- Chaffoy de Coucelles,D. (1985)
J.Biol.Chem. 260: 15762-15770
- 425.- Lapetina,E.G., Cuatrecasas,P. (1979)
Biochim.Biophys.Acta 573: 394-402
- 426.- Mitchell,K.T., Ferrell,J.E., Huestis,W.H. (1986)
Analytical Biochemistry 158: 447-453
- 427.- Pollock,W.K., Rink,T.J., Irvine,R.F. (1986)
Biochem.J. 235: 869-877
- 428.- Irvine,R.F., Letcher,A.J., Heslop,J.P., Berridge,M.J. (1986)
Nature 320: 631-634
- 429.- Berridge,M.J., Dawson,R.M.C., Downes,C.P., Heslop,J.P., Irvine,R.F. (1983)
Biochem.J. 212: 473-482
- 430.- Dixon,J.F., Hokin,L.E. (1984)
J.Biol.Chem. 259: 14418-14425
- 431.- Ingeman,C., Smith,J.R., Silver,M.J. (1979)
Thromb.Res. 16: 335-344
- 432.- Cardinal,D.C., Flower,R.J. (1980)
J.Pharmacol.Methods 3: 135-158
- 433.- Ingeman,C., Smith,J.R., Silver,M.J. (1983)
J.Lab.Clin.Med. 101: 44-52
- 434.- Sternweis,P.C., Gilman,A.G. (1982)

- 435.- Bigay,J., Deterre,P., Pfister,C., Chabre,M. (1985)
FEBS Lett.91: 181-185
- 436.- Huff,R.M., Neer,J. (1986)
J.Biol.Chem. 261: 1105-1110
- 437.- Friesen,L.L., Gerrard,J.M. (1985)
Am.J.Pathol. 121: 79-87
- 438.- Schacht,J. (1976)
J.Neurochem. 27: 1119-1124
- 439.- Downes,C.P., Michell,R.H. (1981)
BiochemJ. 198: 133-140
- 440.- Carney,D.H., Scott,D.L., Gordon,E.A., LaBelle,E.F. (1985)
Cell, 42: 479-488
- 441.- Blackwell,G.J., Duncombe,W.G., Flower,R.J., Parsons,M.F., Vane,J.R. (1977)
Br. J. Pharmac. 59: 353-366
- 442.- Dise,C.A., Burch,J.W., Goodman,D.B.P. (1982)
J.Biol.Chem. 257: 4701-4704
- 443.- Smith,J.B., Lands,W.E.M (1971)
J.Biol.Chem. 246: 6700-6702
- 444.- Handagama,P.J., Jain,N.C., Feldman,B.F., Kono,M.S. (1987)
Am.J.Vet.Res. 48 (6): 1003-1006
- 445.- Gresele,P., Deckmyn,H., Huybrechts,E., Vermeylen,J. (1984)
Biochem.Pharmacol. 33: 2083-2088
- 446.- Stuart,M.J., Gerrard,J.M., White,J.G. (1980)
Blood, 55: 418-423
- 447.- Leslie,B.R., (1978)
N.Eng.J.Med. 298: 1312-1313
- 448.- Vaziri,N.O. (1983)
Amer.J.Nephrol. 3: 1-6

- 449.- Rasedee,A., Feldman,B.F., Washabau,R. (1986)
Acta.Vet.Scand. 27, 369-377
- 450.- Green,R.A., Russo,E.A., Greene,R.T., Kabel,A.L. (1985)
J.A.V.M.A. 186: 485-488
- 451.- Jackson,C.A., Greaves,M., Patterson,A.D. Brown,C.B.,
Preston,F.E. (1982)
British J. Haematology 52: 69-77
- 452.- Wilson,D.B., Neufeld,E.J., Majerus,P.W. (1985)
J.Biol.Chem. 260: 1046-1051
- 453.- Bocckino,S.B., Blackmore,P.F., Exton,J.H. (1985)
J.Biol.Chem. 260: 14201-14207
- 454.- Satiel,A.R., Fox,J.A., Sherline,P., Cuatrecasas,P. (1986)
Science 233: 967-972
- 455.- Moscat,J., Moreno,F., Herrero,C., López,C., García-Barreno,P. (1988)
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85: 659-663
- 456.- Nunn,D.L., Watson,S.P. (1987)
Biochem.J. 243: 809-813
- 457.- Chaffoy de Coucelles,D., Roevens,P., Van Belle, H., Kennis,L., Somers,Y., De
Clerk,F. (1989)
J.Biol.Chem. 264: 3274-3285
- 458.- Watson,S.P., Ganong,B.R., Bell,R.M., Lapetina,E.G. (1984)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 121: 386-391
- 459.- Krishnamurthi,S., Joseph,S.K., Kakkar,V.V. (1986)
FEBS Lett. 196: 365-369
- 460.- Dawson,R.M.C., Hemington,N.L., Irvine,R.F. (1985)
Biochem.J. 230: 61-68
- 461.- Das,S., Rand,R.P. (1984)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 124 (2): 494-496
- 462.- Krishnamurthi,S., Joseph,S., Kakkar,V.V. (1987)
Biochim.Biophys.Acta 927: 429-436

- 463.- Halenda,S.P., Rehm,A.G. (1987)
Biochem.J. 248: 471-475
- 464.- Lapetina,E.G (1990)
Comunicación personal
- 465.- Balsinde,J., Díez,E., Mollinedo,F. (1988)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 154: 502-508
- 466.- Rubin,R. (1988)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 156: 1090-1096
- 467.- Rittenhouse-Simmons,S., Deykin,D. (1978)
Biochim.Biophys.Acta 543: 409-422
- 468.- Pelech,S.L., Vance,D.E. (1989)
Trends.Biochem.Sci. 14: 28-30
- 469.- Silk,S.T., Clejan,S., Witkom,K. (1989)
J.Biol.Chem. 264: 21466-21469
- 470.- Sutherland,C.A., Amin,D. (1982)
J.Biol.Chem. 257: 14006-14010
- 471.- Derksen,A., Cohen,P. (1975)
J.Biol.Chem. 250: 9342-9347
- 472.- Meade,C.J., Turner,G.A., Bateman,P.E. (1986)
Biochem.J. 238: 425-436
- 473.- Best,l., Sener,A., Mathias,P.C., Malaisse,W.J. (1984)
Biochem.Pharmacol. 33: 2657-2662
- 474.- Burgoyne,R.D., Cheek,T.R., O'Sullivan,A.J. (1987)
Trends.Biochem.Sci. 12: 332-333
- 475.- Burch,R.M., Axelrod,J. (1987)
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84: 6374-6378
- 476.- Wang,J., Kester,M., Dunn,M.J. (1988)
Biochem.Biophys.Acta 963: 429-435
- 477.- Nakashima,S., Nagata,K.I., Veeda,K., Nozawa,Y. (1988)
Arch.Biochem.Biophys. 261: 375-383
- 478.- Bocckino,S.B., Blackmore,P.F., Wilson,P.B., Exton,J.H. (1987)

J.Biol.Chem. 262: 15309-15315

- 479.- Martin,T.W., Michaelis,K. (1989)
J.Biol.Chem. 264: 8847-8856
- 480.- Murer,E.H. (1988)
"Platelet Membrane Receptors: Molecular Biology, Immunology, Biochemistry and Pathology",Ed.G.A.Jamieson. pags.493-498 (Alan R. Liss,Inc., New-York)
- 481.- Brass,L.F., Marilyn,J., Mannung,D.R. (1988)
J.Biol.Chem. 263 (11): 5348-5355
- 482.- Brindley,D.N. (1984)
Prog.Lipid.Res., 23: 115-133
- 483.- Knight,D.E., Scrutton,M.C. (1984)
Biochem.Soc.Trans. 12: 969-972
- 484.- Harris,R.H., Nichols,R., Schmeling,J.W., Ramwell,R.W. (1981)
Thromb.Res. 23: 521-525
- 485.- Fratantoni,J.C., Poindexter,B.J. (1981)
Thromb.Res. 22: 157-166
- 486.- Linder,B.L., Goodman,D.S. (1982)
Blood 60: 436-445
- 487.- Chignard,M., Vargaftig,B.B. (1976)
Eur.J.Pharmacol. 38: 7-13
- 488.- Clemmons,R.M., Meyers,K.M. (1984)
Am.J.Vet.Res. 45: 137-144